



β -PEPTIDES CYCLOBUTANIQUES

Carlos Fernandez

► To cite this version:

Carlos Fernandez. β -PEPTIDES CYCLOBUTANIQUES. Chimie organique. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II, 2008. Français. NNT : 2008CLF21870 . tel-00731023

HAL Id: tel-00731023

<https://theses.hal.science/tel-00731023>

Submitted on 11 Sep 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'Ordre : D.U. 1870

UNIVERSITE BLAISE PASCAL

(U.F.R. de Recherche Scientifique et Technique)

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES FONDAMENTALES

N°587

THESE

Présentée pour obtenir le grade de

DOCTEUR D'UNIVERSITE

(Spécialité : CHIMIE ORGANIQUE)

PAR

Carlos FERNANDES

β -PEPTIDES CYCLOBUTANIKUES

(Master Recherche en 2005)

Soutenue publiquement le 31 Octobre 2008 devant la Commission d'Examen :

Membres du jury :

M. David J. AITKEN, Professeur à l'Université Paris sud, Orsay.

M. Fabrice ANIZON, Professeur à l'Université Blaise Pascal, Clermont F^d.

Mme. Monique CALMES, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Montpellier I, Montpellier (rapporteur).

Mme Sophie FAURE, Chargé de recherche CNRS à l'Université Blaise Pascal, Clermont F^d.

M. Philippe LE GREL, Maître de Conférences à l'Université de Rennes I, Rennes (rapporteur).

Mme Maria Rosa ORTUNO, Professeur à l'Université Autonome de Barcelone, Barcelone.

Mlle Elisabeth PEREIRA, Maître de Conférences à l'Université Blaise Pascal, Clermont F^d.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier **Jean Bolte**, Professeur à l'Université Blaise Pascal de Clermont-Ferrand, ex-directeur de l'UMR 6504 (SEESIB) de m'avoir accueilli au sein du laboratoire.

Je suis très reconnaissant envers **David J. Aitken**, Professeur à l'Université Paris Sud – Orsay, de m'avoir fait confiance et pour son encadrement au cours de cette thèse.

Je remercie **Monique Calmes**, Directeur de Recherche CNRS à l'Université de Montpellier I et **Philippe Le Grel**, Maître de Conférences à l'Université de Rennes I pour avoir jugé ce travail et accepté d'en être les rapporteurs.

Je remercie également les Professeurs **Maria Rosa Ortuño** de l'Université autonome de Barcelone et **Fabrice Anizon** de l'Université Clermont-Ferrand II pour avoir accepté de résider au sein de mon jury de thèse.

Je remercie tous les membres du rez-de-chaussée du bâtiment 4 avec lesquels j'ai passé trois années inoubliables :

Elisabeth Pereira pour son encadrement quotidien et ses précieux conseils. **Sophie Roy-Faure** pour sa disponibilité et son écoute. **Vincent Théry** qui trouvait le temps pour m'apporter son soutien en mod. mol. **Roland, Olivier, Claude, Stéphane, Samir** et les autres avec qui j'ai échangé des discussions et moments enrichissants.

Je remercie la bande de "fou-fou" pour les bons moments que nous avons passés et pour leur endurance à toute épreuve : **Marielle** (Bill), **Thomas** (B-B), **Aurélien** (Mini-M), **Marie-Laure, Sidonie, Fadoua, Anthony** (Break-D), **Mickael, Marlène, Greg** dit le boulet, **José**.

Je remercie également ma **famille** et ma **belle famille au complet** pour leur soutien, mes amis : **Emmanuelle** avec qui j'ai beaucoup partagé, **Delphine, Didier, Richard**, la bande de l'**EREA** (Nico, Camille, Brigitte, Eric, Danielle) pour leurs encouragements.

Je remercie tous les **gens** du laboratoire pour leur bonne humeur et leur dynamisme au quotidien.

Et surtout, je remercie principalement **Loïc** qui supporte tout et m'aide sans cesse à avoir confiance en moi.

INTRODUCTION	11
I-LES β-AMINOACIDES.....	13
1) Généralités et définitions	13
2) La biosynthèse des β-aminoacides	15
3) Activité biologique des β-aminoacides et des molécules qui les contiennent.....	16
a) Les β -aminoacides libres.....	17
b) Les β -aminoacides conjugués	18
c) Les β -aminoacides dans les macrocycles	20
d) Les β -aminoacides et les β -lactames.....	23
e) Les β -peptides : oligomères de β -Aminoacides	23
II-LES β-PEPTIDES FOLDAMERES.....	27
1) Les foldamères.....	27
2) Les structures secondaires dans les β-peptides	29
a) La formation des hélices et des feuillets	30
b) Les hélices.....	33
c) Les feuillets	40
d) Les coudes.....	41
3) Les β-peptides oligomères des β-aminoacides cycliques.....	42
III-OBJECTIFS DE CE TRAVAIL	45
RESULTATS ET DISCUSSION : PREMIERE PARTIE - SYNTHESE.....	47
I-SYNTHESE DE β-AMINOACIDES ALICYCLIQUES : RAPPELS	
BIBLIOGRAPHIQUES.....	49
1) β-Aminoacides à 5 et 6 chaînons.....	49
a) Réarrangements de dérivés d'acides 1,2 dicarboxyliques	50
i) Version racémique	50
ii) Version énantiosélective	51
b) Additions de Michael	52
i) Version racémique	52
ii) Version stéréosélective	53
c) A partir des β -lactames.....	54
i) Fonction hydroxyle en position 3	54
ii) Fonction hydroxyle en position 4	56
d) Formation de cycles	57
e) A partir de composés aromatiques	58
f) Ouverture d'époxyde.....	59
2) β-aminoacides bicycliques et à cycles moyens	60
3) β-aminoacides à 4 et 3 chaînons.....	63
a) La réactivité intrinsèque d'un petit cycle.....	63
b) Synthèse de dérivés cyclopropaniques.....	64
i) Réarrangements de dérivés d'acides 1,2-dicarboxyliques.....	64
ii) Synthèse via la méthanolhomosérine.....	65
iii) Cyclopropanation d'oléfines protégées.....	65
c) Synthèse de dérivés cyclobutaniques	66
i) Réarrangements de dérivés 1,2-dicarboxyliques	66
ii) Construction de cycle par voie thermique	70
iii) Construction de cycle par voie photochimique	70
II-1^{ère} METHODE D'ACCES AUX 4 STEREOISOMERES DE L'ACBC.....	73
1) Présentation de la stratégie	73
2) Etudes en série racémique.....	74
a) Synthèse du cis-aminoacide (\pm)-105	74

b) Etudes sur l'épimérisation de l'adduit bicyclique (±)-127	75
c) Etudes sur l'épimérisation de l'uréidoacide (±)-128	77
i) Synthèse de l'ester de méthyle (±)-139	77
ii) Epimérisation de l'uréidoester (±)-139	78
d) Etudes sur l'épimérisation de l'acide (±)-105	79
i) Protection de l'acide (±)-105	80
ii) Epimérisation de l'ester (±)-147	82
iii) Déprotection de l'acide (±)-150	84
e) Bilan de la synthèse racémique	84
3) Application à la synthèse des β -aminoacides énantiomériquement purs.....	85
4) Bilan de la première méthode de synthèse.....	87
III-2^{ème} METHODE D'ACCES AUX 4 STEREOISOMERES DE L'ACBC	91
1) Présentation de la stratégie	91
2) Etudes de dédoublement.....	94
a) Etudes sur le dédoublement de l'uréidoacide (±)-128	94
b) Etudes sur le dédoublement de l'acide (±)-105	96
i) Préparation de dérivés diastéréoisomériques du composé (±)-149.....	96
c) Bilan des études sur le dédoublement racémique	99
3) Clivage de la copule chirale.....	100
a) Hydrolyse des amides diastéréoisomères	100
i) Hydrolyse en milieu acide (HCl 6 M).....	100
ii) Hydrolyse en milieu basique.....	102
iii) Hydrolyse de (±)-187 par le complexe chlorure de cuivre/glyoxale	102
iv) Hydrolyse enzymatique de (+)-187 et (+)-188	103
v) Bilan des études d'hydrolyse des amides diastéréoisomères.....	104
b) Débenzylation des amides diastéréoisomères	105
i) Débenzylation de (+)-187 en milieu acide.....	106
ii) Débenzylation de (+)-187 et (+)-188 avec le sodium dans l'ammoniac	108
iii) Débenzylation de (-)-189 et (-)-190 avec des oxydants	109
iv) Bilan sur les débenzylation	110
4) Transformations clés de l'amide 194.....	111
a) Préparation de l'amide (±)-194.....	112
b) Méthanolyse de (±)-194	112
c) Hydrolyse de (±)-194	115
i) Hydrolyse en milieu acide	115
ii) Hydrolyse neutre.....	117
iii) Hydrolyse en milieu basique	118
iv) Bilan des transformations de l'amide (±)-194 et accès au (±)-trans-ACBC	121
5) Application à la synthèse des β -aminoacides énantiomériquement purs.....	122
6) Bilan de la 2 ^{ème} méthode de synthèse.....	124
7) Comparaison de la 1 ^{ère} et de la 2 ^{ème} méthode de synthèse.....	126
IV-PREPARATION D'OLIGOMERES DU trans-ACBC.....	129
a) Synthèse du dimère (-)-209	130
b) Synthèse du tétramère (-)-214	132
c) Synthèse de l'hexamère (-)-217	134
d) Synthèse de l'octamère (-)-219	135
RESULTATS ET DISCUSSIONS : DEUXIEME PARTIE – ANALYSE	
CONFORMATIONNELLE	137
I-TECHNIQUES D'ANALYSE DE β-PEPTIDES.....	139
1) Rappels bibliographiques.....	139

a) La RMN	139
i) La spectroscopie par RMN 1D	139
ii) La spectroscopie par RMN 2D	143
b) Le dichroïsme circulaire	146
c) Le dichroïsme circulaire vibrationnel	150
d) L'infrarouge	150
e) Les rayons X	151
f) La modélisation moléculaire	151
g) Conclusion	153
2) Analyse conformationnelle des oligomères du (–)-(1<i>R</i>,2<i>R</i>)-ACBC	154
a) Etudes par RMN	154
1) Attribution des protons des oligomères	155
2) Influence de la température sur les hydrogènes NH	158
3) Etude de l'échange chimique H/D	165
4) RMN à deux dimensions	167
b) Etude par dichroïsme circulaire	179
c) Etude de modélisation moléculaire	182
CONCLUSION	191
EXPERIMENTAL SECTION (In English)	195
1) General methods	197
a) Instrumentation	197
b) Chromatography	198
c) Chemical and Solvents	198

Préambule

Les foldamères sont des oligomères de synthèse qui, comme les protéines et les acides nucléiques, adoptent des conformations repliées en solution. Parmi les différents foldamères connus, on trouve les structures secondaires en coude, en feuillet, en hélice et les structures tertiaires en doubles hélices, à l'instar de l'ADN.

A la fois proches et éloignés des biomolécules dont ils sont inspirés, les foldamères pourraient trouver des applications dans les domaines de la thérapie, par exemple dans la reconnaissance de surface de protéines.

Ces édifices moléculaires organiques sont obtenus par synthèse multi-étapes et sont caractérisés ensuite par différentes techniques d'analyse structurale. Les techniques analytiques les plus fréquemment utilisées pour la détermination de structure sont des outils spectroscopiques comme la RMN, l'infrarouge, le dichroïsme circulaire (UV et IR) mais également les rayons X de monocristaux. En complément, la modélisation moléculaire apporte un élément prédictif des conformations possibles en solution.

La chimie biomimétique et notamment celle des composés peptidomimétiques a jusqu'à récemment été focalisée sur des petites structures constituées de quelques aminoacides. Les travaux récents sur les foldamères montrent qu'ils adoptent des structures secondaires plus stables que leurs analogues naturels. C'est le cas des β -peptides, oligomères constitués d'un enchaînement de β -aminoacides.

Une activité de recherche croissante a vu le jour dans ce domaine et en seulement 20 années d'études, des résultats prometteurs ont marqué dans la chimie peptidique. En espèce, il est possible d'obtenir des foldamères de type coude, feuillet et hélice, à partir de simple oligomères de β -peptides par un choix judicieux des blocs de construction. Cette structuration est encore plus prononcée lorsque les β -peptides sont constitués de β -aminoacides alicycliques.

Cependant, au début de nos travaux, il manquait une pierre à l'édifice pour étoffer le tableau des oligomères de β -aminoacides alicycliques. En effet, des études ont été menées sur des cycles à 6 et 5 chaînons et sur le cycle à 4 chaînons de configuration *cis*. Par contre, aucune

étude a été publiée concernant les oligomères de l'acide *trans*-2-aminocyclobutanecarboxylique (*trans*-ACBC).

Cette case manquante dans le tableau des β -peptides est expliquée par le fait que le bloc de construction principal, le *trans*-ACBC, n'avait jamais été synthétisé sous forme énantiopure. Il était donc impossible d'étudier des oligomères du *trans*-ACBC.

Nous présenterons dans cette thèse, le développement de deux voies de synthèse complémentaires pour accéder aux 4 stéréoisomères de l'ACBC, dont les deux énantiomères de configuration relative *trans*, **préparés pour la première fois**.

Ensuite, il sera détaillé la synthèse du dimère, tétramère, hexamère et octamère du composé (1*R*,2*R*)-*trans*-ACBC, grâce à l'utilisation de conditions de couplage adaptées, afin d'accéder à chaque oligomère désiré avec un rendement convenable.

Ainsi, la première analyse conformationnelle menée à l'aide de différents outils expérimentaux et numériques sera décrite, conduisant à l'identification d'un foldamère.

INTRODUCTION

I-LES β -AMINOACIDES

1) Généralités et définitions

Il existe une très grande variété d'acides aminés dans la Nature, ils peuvent être classés en deux groupes distincts : les acides aminés protéogéniques et non-protéogéniques.

Le groupe des acides aminés protéogéniques est composé exclusivement d' α -acides aminés, lesquels sont utilisés par les organismes vivants pour construire des protéines (Figure 1). Ils sont au nombre de vingt selon la nature du groupement R et sont tous de configuration L (S) selon la représentation de Fischer.

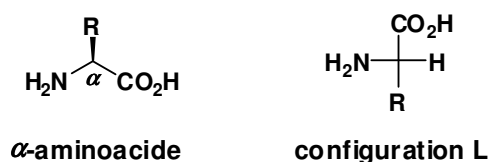


Figure 1

Le groupe des acides aminés non protéogéniques naturels est constitué des autres α -acides aminés, ainsi que leurs homologues β -, γ -, et δ - (Figure 2). Les acides aminés qui composent ce groupe existent à l'état libre ou constitutifs de structures moléculaires complexes^{1,2,3}. L'abondance de ces acides aminés dans la nature décroît avec l'augmentation du nombre de carbones dans la chaîne séquentielle. Par conséquent, les δ -acides aminés sont plus rares que les α -acides aminés.

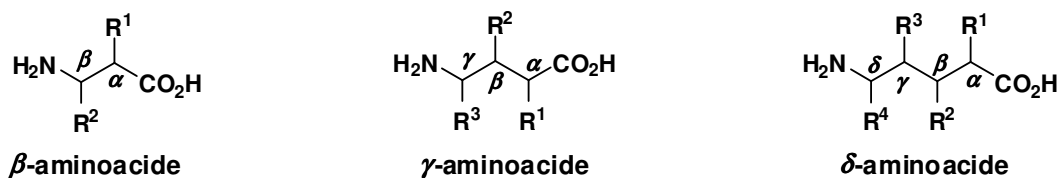


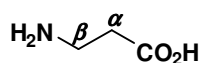
Figure 2

¹ Kajirawa, Y. ; Scott, A. I. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 8795-8796

² a) Shemin, D. ; Russell, C. S. *J. Am. Chem. Soc.* **1953**, 75, 4873-4874, b) Voirol, M. W. ; Lob, M. *Social and preventive medicine* **1971**, 16, 333-341

³ Seebach, D. ; Beck, A. K. ; Bierbaum, D. J. *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, 1111-1239

Les β -aminoacides peuvent être considérés comme les homologues directs des α -aminoacides, possédant un carbone supplémentaire sur le squelette principal. Par conséquent, la fonction amine est portée par le carbone en β . La β -Alanine (β -Ala) demeure le plus simple des β -aminoacides puisqu'il ne porte aucun substituant (Figure 3).



**β -Alanine
(β -Ala)**

Figure 3

Contrairement aux α -aminoacides qui sont mono- ou disubstitués en position α , les β -aminoacides peuvent être diversement substitués sur les carbones α et/ou β (C-2 et C-3) (Figure 4). Ainsi, les β -aminoacides sont classés selon le type de substitution : à titre d'exemple, les β -aminoacides mono-substitués en C-2 ont la dénomination " β^2 -aminoacide", et les β -aminoacides disubstitués en C-3 ont la dénomination " $\beta^{3,3}$ -aminoacide"

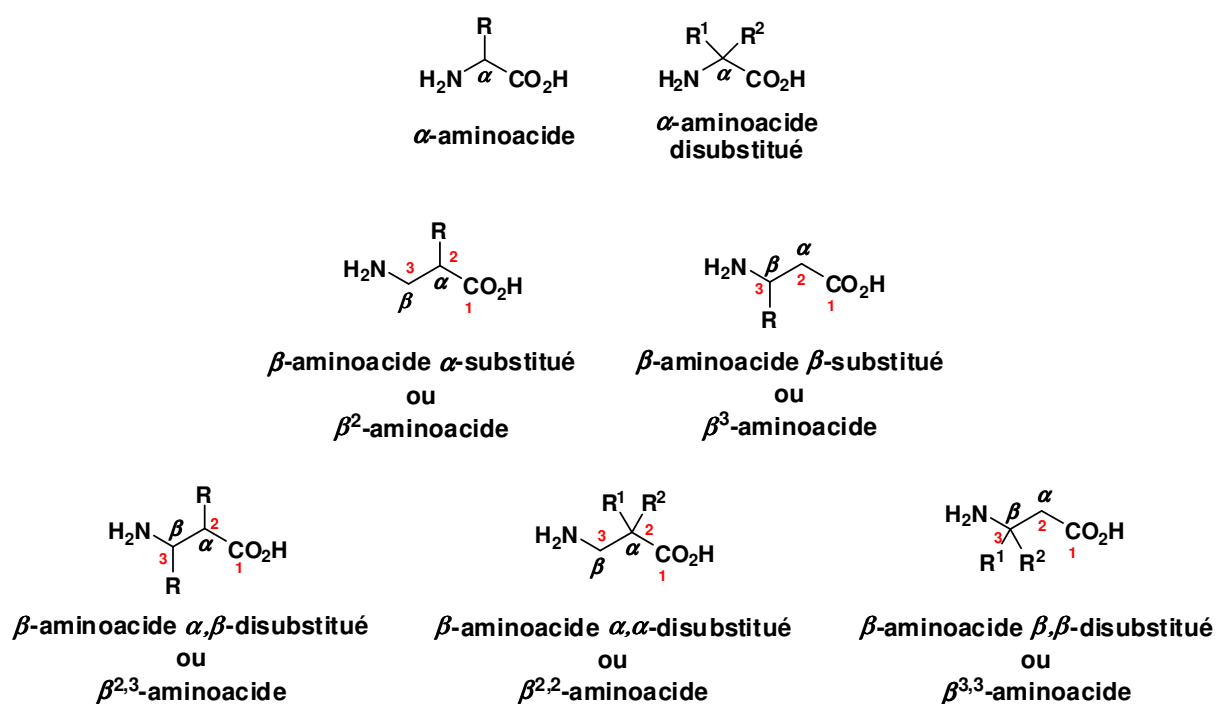


Figure 4

Dans la Nature, il a été recensé différents β -aminoacides intégrant l'une des classes décrites ci-dessus. La plupart de ces β -aminoacides est présente dans les végétaux, les micro-organismes ou encore dans les organismes marins².

2) La biosynthèse des β -aminoacides

Les β -aminoacides sont des intermédiaires connus dans le métabolisme des différents règnes vivants, mais ils sont répartis de façon inégale. Par exemple, ils sont fréquemment rencontrés dans les microorganismes *a contrario* des mammifères⁴.

L'apparition des β -aminoacides dans la nature se décline sous deux formes^{5,6} : à l'état libre ou bien présent dans une entité moléculaire.

Il existe plusieurs voies métaboliques qui fournissent des β -aminoacides par la transformation de métabolites simples. Parmi ces voies identifiées, la biotransformation de dérivés d'uracile constitue une approche pour obtenir des β^2 -aminoacides⁷ (Figure 5). Deux enzymes vont catalyser la transformation des bases pyrimidiques pour fournir exclusivement la β -Ala et la β^2 -méthyl-Ala.

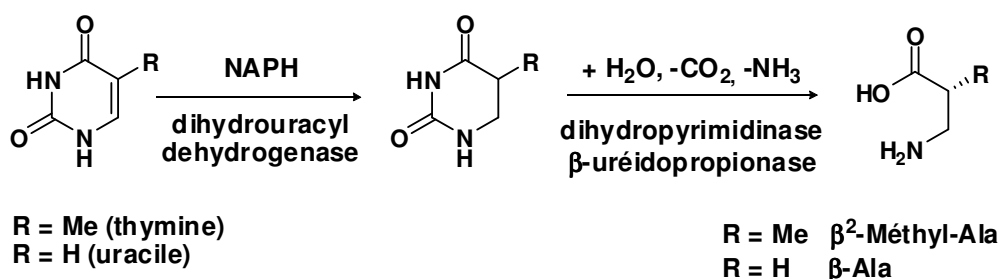


Figure 5

Une autre voie métabolique plus générale, utilise les α -aminoacides pour former des β^2 - et des β^3 -aminoacides⁴. Ainsi, la β^2 -méthyl-Ala est obtenue à partir de la L-valine par une série de transformations faisant intervenir plusieurs enzymes (Figure 6a)⁵. Les dérivés β^3 -alkyl-aminoacides sont biosynthétisés en une seule étape par action de l'enzyme 2,3-aminomutase (Figure 6b). C'est une enzyme qui est présente chez les plantes, les cyanobactéries et les champignons^{8,9}. Dans des cas plus rares, cette enzyme est capable de synthétiser des $\beta^{2,3}$ -aminoacides comme le montre l'exemple de *Taxus brevifolia* (if du pacifique) qui biosynthétise l' α -hydroxy- β -phénylalanine présent dans la structure du taxol¹⁰ (cf. Figure 14).

⁴ Von Nussbaum, F. ; Spiteller, P. Highlights in Bioorganic Chemistry, **2004**, 63-89

⁵ Griffith, O. W. *Ann. Rev. Biochem.* **1986**, *55*, 855-878

⁶ Bewley, C. A.; Faulkner, D. J. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1998**, *37*, 2162-2178.

⁷ Seebach, D. : Beck, A. K. : Bierbaum, D. J. *Chem. Biodivers.* **2004**, 1, 1111-1239

⁸ Spiteller, P.; von Nussbaum, F.; Steglich, W. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2000**, 39, 2754-2756

⁹ Tillett, D. ; Dittman, E. ; Erhard, M. ; von Döhren, H. ; Börner, T. *Chem. Biol.* **2000**, 33, 753-764

¹⁰ Spiteller, P. ; von Nussbaum, F. Highlights in Bioorganic Chemistry, **2004**, 90-106

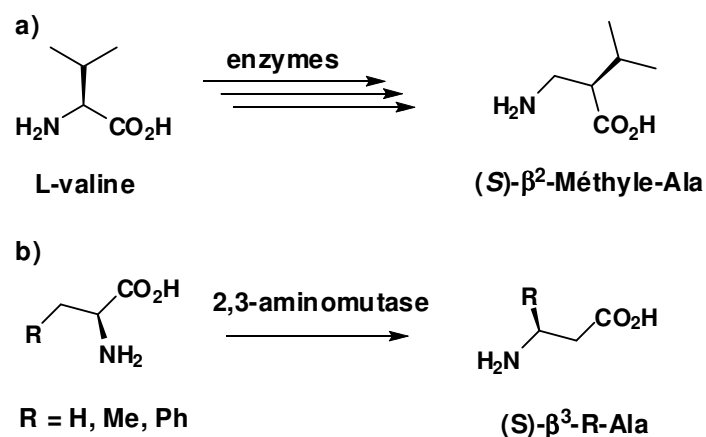


Figure 6

Les β-aminoacides sont souvent rencontrés dans des entités moléculaires et ils se forment pendant la construction de ces entités. La biosynthèse de l'aphélandrine est un exemple où on voit la formation du β-aminoacide pendant la construction de la biomolécule¹¹ (Figure 7). Le β-aminoacide de type β³-aryle est formé par une réaction intramoléculaire de type Michael entre le dérivé de l'acide cinnamique et l'amine primaire.

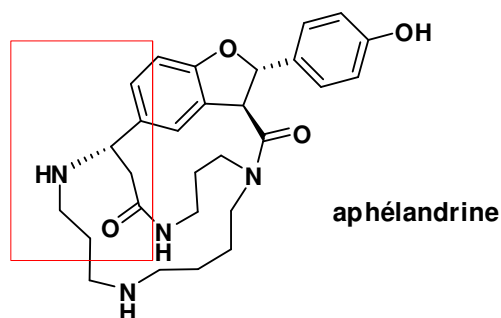


Figure 7

Nous avons montré ici qu'une infime partie des procédés naturels qui conduisent à la l'apparition de motifs β-aminoacides variés, biosynthétisés soit à l'état libre, soit pendant la construction de molécules complexes.

3) Activité biologique des β-aminoacides et des molécules qui les contiennent

¹¹ Nezbedová, L. ; Hesse, M. ; Drandarov, K. ; Werner, C. *Helv. Chim. Acta* **2001**, *84*, 172-179

a) Les β -aminoacides libres

Il y a très peu de β -aminoacides présents à l'état libre dans la Nature, et encore moins des β -aminoacides qui possèdent une activité biologique. La cispentacine est un β -aminoacide alicyclique naturel. Elle a été isolée de *Bacillus cereus* et de *Streptomyces setonii* par deux groupes japonais¹² (Figure 8). Cette molécule possède une forte activité cytotoxique sur la levure *Candida albicans*.

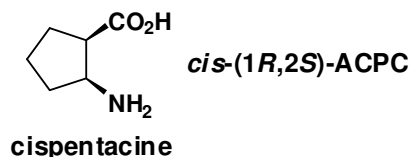


Figure 8

Dans les cycles de plus grande taille qui sont connus pour exercer une activité biologique, la cocaïne est un exemple de cycle à 6 chaînons qui montre une forte activité envers le système nerveux central chez l'homme¹³ (Figure 9).

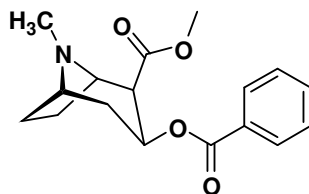


Figure 9

La tilidine, β -aminoacide alicyclique synthétique, a été préparée pour la première fois en 1979. C'est un analgésique opioïde employé en thérapie pour contrôler les douleurs modérées à importantes¹⁴ (Figure 10).

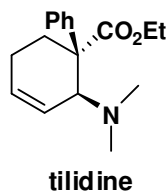


Figure 10

¹² a) Konishi, M. ; Nishio, M. ; Saitoh, K. ; Kawaguchi, H. *J. Antibiot.*, **1989**, 42, 1749-1755, b) Oki, T. ; Hirano, M. ; Kamei, H. *J. Antibiot.*, **1989**, 42, 1756-1762, c) Iwamoto, T. ; Tsujii, E. ; Ezaki, M. ; Sakane, K. *J. Antibiot.*, **1990**, 43, 1-7, d) Kawabata, K. ; Inamoto, Y. ; Sakane, K. ; Hashimoto, S. *J. Antibiot.*, **1990**, 43, 513-518

¹³ Humphrey, A. J. ; O'Hagan, D. *Nat. Prod. Rep.* **2001**, 18, 494-402

¹⁴ a) Overman, L. E. ; Petty, C. B. ; Doedens R. J. *J. Org. Chem.* **1979**, 44, 4183-4185, b) Fülöp, F. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 2181-2204

Les β -aminoacides synthétiques BAY 9379 et le PLD-118 ont eux aussi révélé une forte activité antifongique sur *Candida albicans*¹⁵, comme la cispentacine (Figure 11).

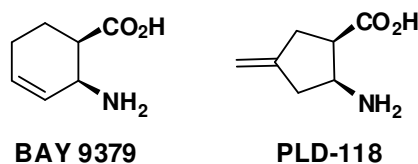


Figure 11

b) Les β -aminoacides conjugués

Le motif cispentacine se retrouve également dans la structure de l'amipurimycine, un antibiotique issu de *Streptomyces novoguineensis* sp. nov. (Figure 12)¹⁶. L'amipurimycine est active contre de nombreux champignons phytopathogènes et en particulier contre le champignon *Pyricularia oryzae* qui est responsable de la maladie de l'éclatement du riz.

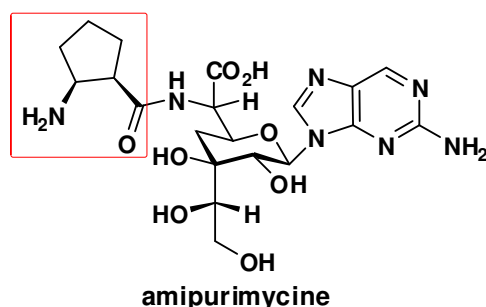


Figure 12

Le résidu β -Ala est souvent rencontré dans beaucoup molécules biologiques dont l'acide pantothénique (vitamine B5) et la *L*-carnosine (figure 13). La vitamine B5 est nécessaire au métabolisme des glucides, lipides, protéines et participe à la synthèse de certaines hormones¹⁷. La *L*-carnosine est un dipeptide (His- β -Ala) qui joue le rôle d'antioxydant contre le radical hydroxyle¹⁸.

¹⁵ Kuhl, M. G. ; Hahn, M. D. ; Mittendorf, J. *Amino Acids* **2005**, 29, 89-100

¹⁶ a) Iwasa, T. ; Kichi, T. ; Matsura, K. ; Wakae, O. *J. Antibiot.* **1977**, 20, 1-9, b) Harada, S. ; Kishi, T. *J. Antibiot.*, **1977**, 30, 11-16, c) Goto, T. ; Toya, Y. ; Ohgi, T. ; Kondo, T. *Tetrahedron Lett.* **1982**, 23, 1271-1274, d) Shauffer, C. S. ; Datta, A. *J. Org. Chem.* **2008**, 73, 4166-4174

¹⁷ a) Babcock, Jr. ; Jukes, D. *J. Org. Chem.* **1940**, 62, 1628-1629, b) Ryan, F. J. ; Ballentine, R. ; Stolovy, E. ; Corson, M. E. ; Schneider, L. K. *J. Org. Chem.* **1945**, 1857-1858, c) Stiller, E. D. ; Harris, S. A. ; Finkelstein, J. ; Keresztesy J. C. ; Folkers, K. *J. Org. Chem.* **1940**, 1783-1790, d) Spry, C. ; Kirk, K. ; Saliba, K. *J. FEMS Microbiol. Rev.* **2008**, 56-106

¹⁸ Vinick, F. J. ; Jung, S. *J. Org. Chem.* **1983**, 48, 392-393

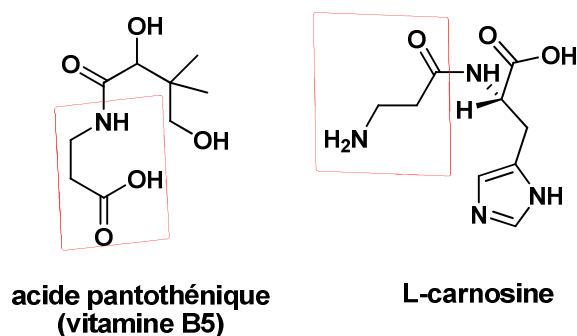


Figure 13

Quelques dérivés terpéniques biologiquement actifs possèdent des résidus β -aminoacides dans leur structure. C'est le cas du taxol, issu de l'if du pacifique *Taxus brevifolia*, constitué d'un tétracycle poly-fonctionnalisé et d'un résidu β^2 -hydroxy- β^3 -phénylalanine (Figure 14). Il fait partie des molécules à activité anticancéreuse qui sont utilisées en chimiothérapie¹⁹.

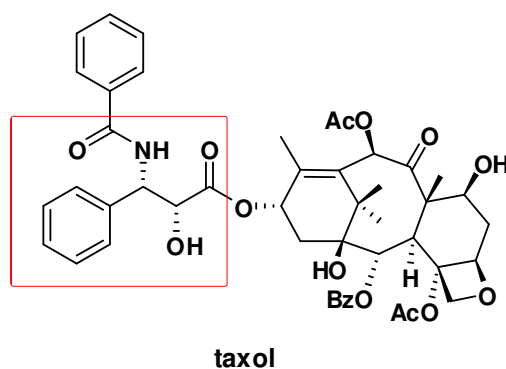


Figure 14

Les β -aminoacides sont incorporés dans la structure de peptidomimétiques à conformation restreinte. Ainsi, l'acide *cis*-2-aminocyclohexanecarboxylique (*cis*-ACHC) est employé comme mime de la proline dans la préparation d'oligopeptides biologiquement actifs²⁰. Le remplacement du résidu proline du tripeptide **GYKI 14766** par le *cis*-ACHC a donné naissance à des inhibiteurs puissants et sélectifs de la thrombine (Figure 15).

¹⁹ Guénard, D. ; Guéritte-Vogelien, F. ; Potier, P. *Acc. Chem. Res.* **1993**, 26, 160-167

²⁰ Harmat, N. J. S. ; Di Bungo, C. ; Criscuoli, M. ; Giorgi, R. ; Lippi, A. ; Martinelli, A. ; Monti, S. ; Subissi, A. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **1998**, 8, 1249-1474

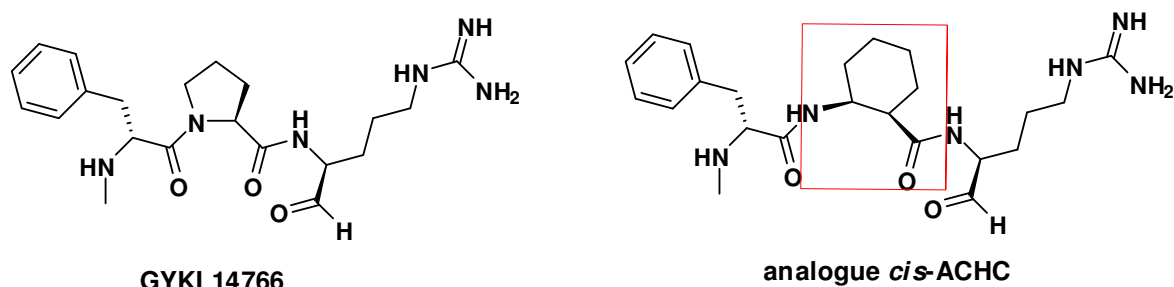


Figure 15

Le même concept a été appliqué à la morphiceptine qui est un tétrapeptide endogène, ligand du récepteur μ , et responsable des effets antalgiques, euphorisants et de détresse respiratoires²¹ (Figure 16). Des analogues de la morphiceptine ont été synthétisés en remplaçant les résidus prolines par les acides *cis*- / *trans*-2-aminocyclopentanecarboxyliques (*cis*- ou *trans*-ACPC). L'analogue *cis*-ACPC s'est révélé actif sur les récepteurs μ et également sur les récepteurs δ qui jouent un rôle dans le contrôle de l'humeur et de la régulation de la fonction ventilatoire.

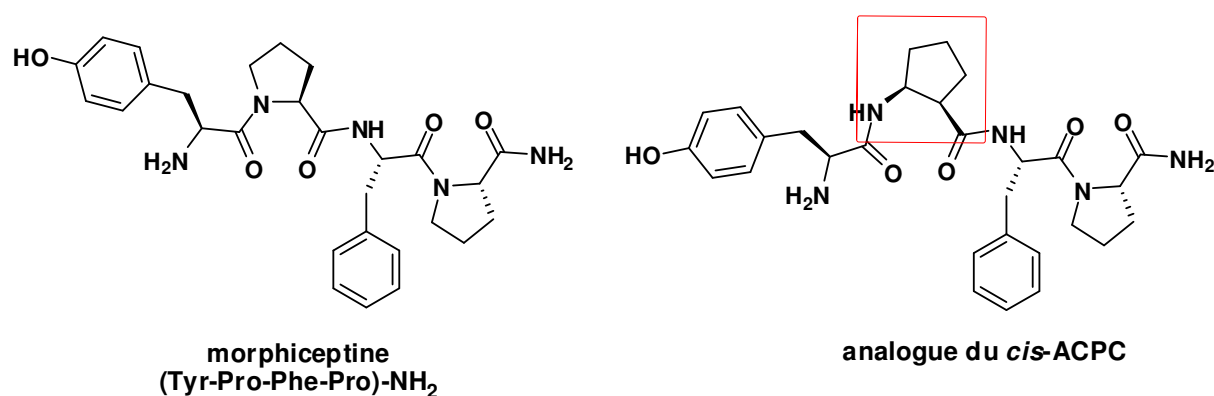


Figure 16

c) Les β -aminoacides dans les macrocycles

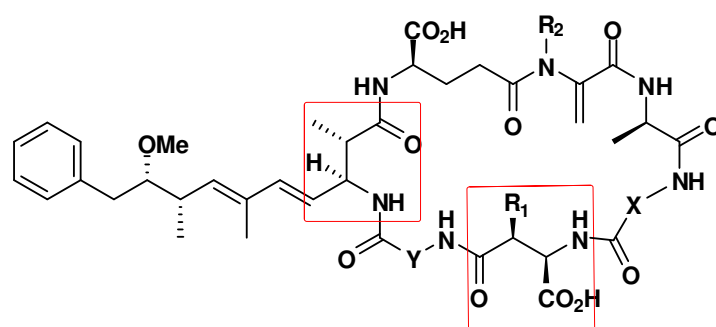
On trouve fréquemment des β -aminoacides dans les macrocycles peptidiques. Nous illustrerons cette famille de molécules à activité biologique par quelques exemples.

Les microcystines appartiennent à une famille de macrocycles à activité hépatotoxique, isolées de cyanobactéries²². Cette famille regroupe plus de 70 composés qui diffèrent selon la nature des résidus X et Y, ainsi que la chaîne latérale R (H ou CH₃). Le cycle constitué de

²¹ Yamazaki, T. ; Probstl, A. ; Schiller, P. W. ; Goodman, M. *Int. J. Peptide Protein Res.* **1991**, 37, 364-381

²² Svrcek, C. ; Smith, D.W. *J. Environ. Eng. Sci.* **2004**, 3, 155-185

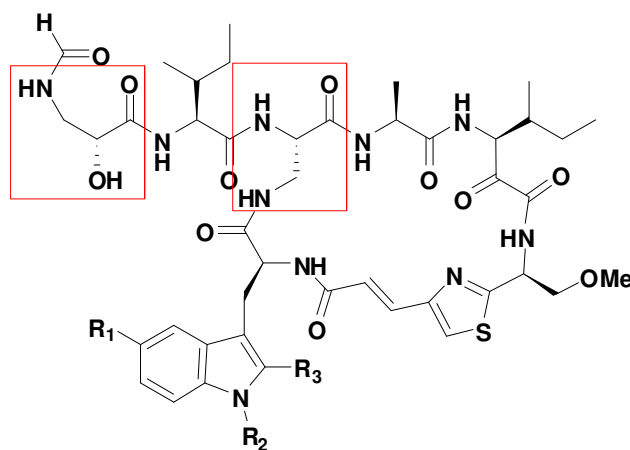
sept acides aminés incorpore dans sa structure deux résidus $\beta^{2,3}$ -aminoacides, dont l'un possédant une chaîne latérale terpénique (Figure 17).



microcystines

Figure 17

Les kéramamides sont isolés d'une éponge *theonella*²³. Comme pour les microcystines, les kéramamides sont une famille de macrocycles qui regroupe un grand nombre de structures obtenues par la combinaison des groupements R^1 , R^2 et R^3 (Figure 18). Le squelette est composé entre autre de deux β -aminoacides dont l'un exocyclique. Cette famille de molécules montre une très forte activité cytotoxique.



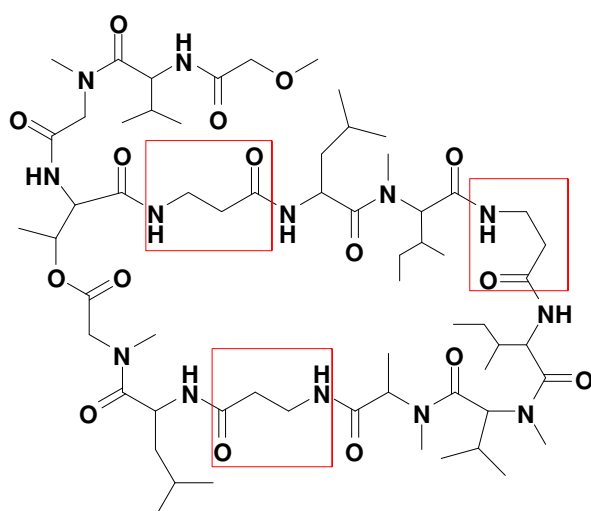
kéramamides

Figure 18

Le théonellapectolide est un macrocycle à activité cytotoxique issu d'une éponge visqueuse *Theonella Swinhoe*²⁴ (Figure 19). Ce macrocycle incorpore 3 résidus β -Ala dans sa structure cyclique, et la dénomination peptolide provient du remplacement d'une liaison peptidique par une liaison ester.

²³ Doi, M.; Ishida, T.; Sasaki, M.; Terashima, A.; Tanaka, C. *Biopolymers* **2000**, 54, 27-34

²⁴ Uemoto, H.; Yahiro, Y.; Kobayashi, J. *Tetrahedron* **1998**, 54, 6719-6724



theonellapeptolide

Figure 19

Dans le but de synthétiser des mimétiques de peptides cycliques naturels, les β -peptides cycliques ont fait l'objet de recherches approfondies. Un β -térapeptide cyclique, analogue β -peptidique d'un fragment de la somatostatine, a montré une affinité pour les récepteurs naturels de la somatostatine²⁵ (Figure 20). Ainsi, avec un faible nombre de résidus, il est possible de créer des peptidomimétiques compétitifs des molécules naturelles.

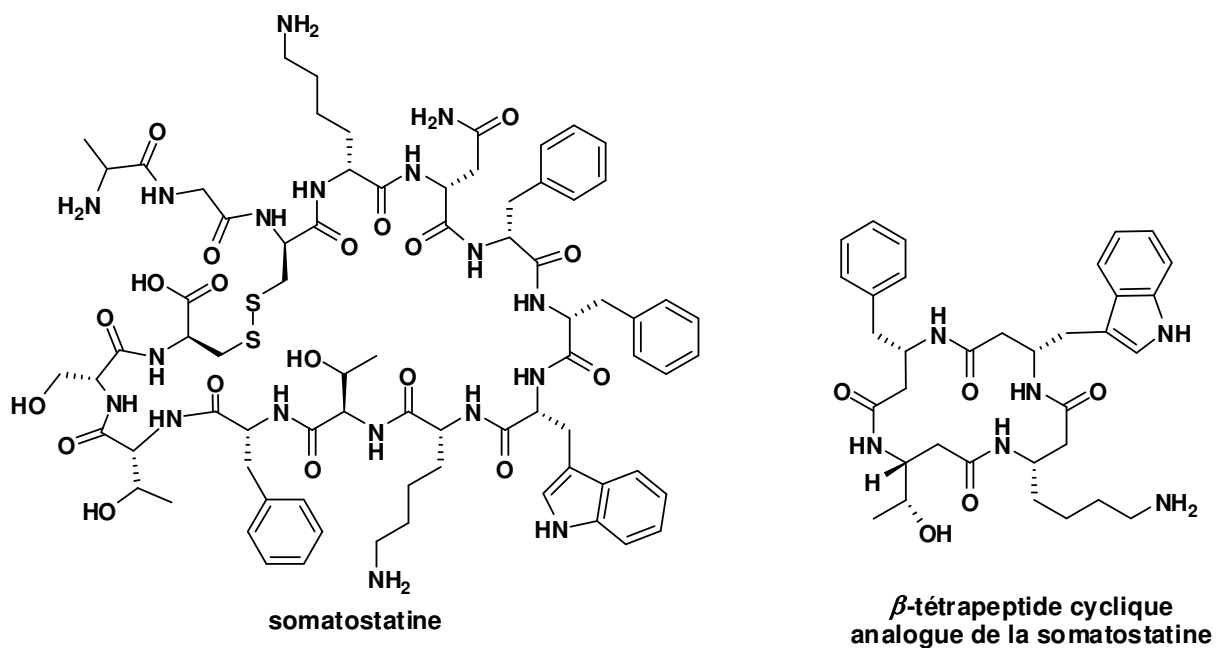


Figure 20

²⁵ a) Gademann, K. ; Ernst, M. ; Seebach, D. ; De Grado, W. F. *Helv. Chim. Acta* **2000**, 83, 16-33, b) Gademann, K. ; Ernst, M. ; Seebach, D. *Ang. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1223-1226

d) Les β -aminoacides et les β -lactames

Il serait impossible de parler des β -aminoacides sans évoquer les β -lactames qui représentent formellement la structure fermée du β -aminoacide. Les β -lactames illustrent une classe pharmaceutique importante dans la catégorie des antibiotiques. Les pénicillines G et V ont été les premiers β -lactames isolés à partir de *penicillium Notatum*, suivi de la céphalosporine C à partir de *Cephalosporium acremonium* (Figure 21)²⁶. Depuis, des études de pharmacomodulation ont été menées pour améliorer l'activité antibactérienne des β -lactames, en termes de sélectivité et de résistance.

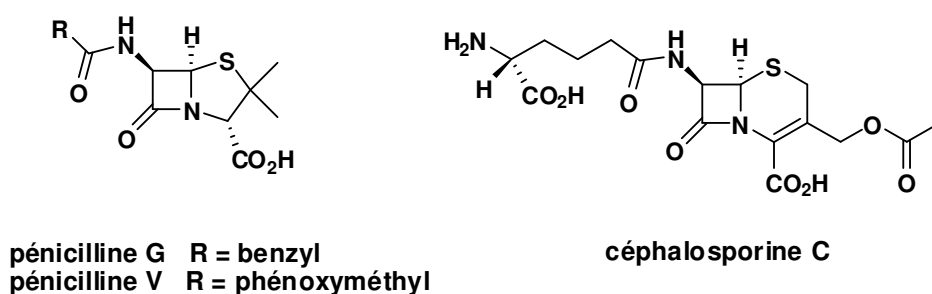


Figure 21

e) Les β -peptides : oligomères de β -Aminoacides

Les α -peptides, qui sont les norologues des β -peptides, agissent principalement comme neurotransmetteurs, neuromodulateurs ou bien comme hormones. Cependant, les peptides natifs sont souvent des substances fragiles, de faible biodisponibilité et facilement hydrolysables par les protéases lorsqu'ils sont administrés par voie orale.

Une manière de contourner ces problèmes consiste à utiliser les β -peptides. En mimant la structure tridimensionnelle, la distribution de charge, l'hydrophobie et l'habilité à engager des liaisons hydrogènes des α -peptides, ces composés sont d'excellents peptidomimétiques.

En effet, les β -peptides sont résistants à la dégradation enzymatique par les protéases, même les plus agressives, *in vivo* et *in vitro*²⁷. Ils sont également capables de franchir aisément la barrière membranaire des cellules²⁸. Ainsi, Frackenpohl *et al.* ont testé la stabilité d'une série de β -peptides vis-à-vis d'enzymes protéolytiques. Ils ont placé des β -

²⁶ a) Sammes, P. G. *Chem. Rev.* **1976**, 76, 113-155, b) Andersson, I. ; Terwisscha, G. ; Van Scheltinga, A. C. ; Valegard, K. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, 58, 1897-1906

²⁷ a) Hinterman, T. ; Seebach, D. *Chimia* **1997**, 50, 244-247, b) Schreiber, J. V. ; Frackenpohl, J. ; Moser, F. ; Fleischmann, T. ; Kohler, H-P. E. ; Seebach, D. *ChemBioChem* **2002**, 3, 424-432

²⁸ Umezawa, N. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 368-369

peptides linéaires et cycliques constitués de 2 à 15 résidus en présence de 15 protéases commerciales dans les conditions favorisant la dégradation des α -peptides. Alors qu'au bout de 15 minutes, les α -peptides étaient complètement dégradés, les β -peptides ont présenté une stabilité exceptionnelle pendant au moins 48 heures²⁹.

Il y a plusieurs applications pour les β -peptides telle :

- les peptides antigènes³⁰
- les peptides amphiphiles antimicrobiens^{31,32}
- les peptides à activité hémolytique⁴⁷
- les mimes d'hormones³³
- les complexes avec l'ADN³⁴

Gellman a étudié l'activité antibactérienne et hémolytique d'une série d'oligomères composés de β -aminoacides cycliques à 5 chaînons³⁵. L'objectif des auteurs était de trouver un peptide à haute activité antibactérienne avec une propriété hémolytique réduite. Parmi ces différents peptides, un seul s'est révélé hautement actif sur une série de quatre bactéries (Figure 22). Les résultats des activités antibactériennes sont reportés dans le tableau 1 ci-dessous.

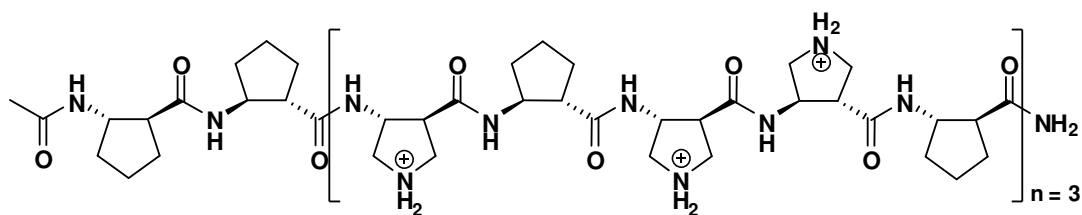


Figure 22

bactérie	Gram	Activité antibactérienne MIC [$\mu\text{g mL}^{-1}$]	Activité antibactérienne de la magainine (référence) MIC [$\mu\text{g mL}^{-1}$]
<i>Enterococcus faecium</i>	-	12.5	25
<i>Staphylococcus aureus</i>	+	3.2	25
<i>Escherichia coli</i>	+	6.3	6.3
<i>Bacillus subtilis</i>	+	0.8	3.2

Tableau 1

²⁹ Frackenpohl, J. ; Arvidsson, P. I. ; Schreiber, J. V. ; Seebach, D. *ChemBioChem* **2001**, 2, 445-455

³⁰ Poenaru, S. ; Lamas, J. R. ; Folkers, G. ; Lopez De Castro, J. A. ; Seebach, D. ; Rognan, D. *J. Med. Chem.* **1999**, 42, 2318-2331

³¹ a) Hamuro, Y. ; Schneider, J. P. ; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 12200-12201, b) Dahui, L. ; DeGrado, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 12200-12201.

³² c) Arvidsson, P. ; Frackenpohl, J. ; Ryder, N. S. ; Lietchy, B. ; Petersen, F. ; Zimmermann, H. ; Camenish, G. P. ; Woessner, R. ; Seebach, D. *ChemBioChem* **2001**, 10, 771-773, c) Arvidsson, P. I. ; Ryder, N. S. ; Weiss, H. M. ; Hook, D. F. ; Escalante, J. ; Seebach, D. *Chem. Biodivers.* **2005**, 2, 401-420

³³ Gademann, K. ; Kimmerlin, T. ; Hoyer, D. ; Seebach, D. *J. Med. Chem.* **2001**, 44, 2460-2468

³⁴ Kimmerlin, T. ; Namoto, K. ; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **2003**, 86, 2104-2109

³⁵ Porter, E. A. ; Wang, X. ; Lee, S. H. ; Weisblum, B. ; Gellman, S. H. *Nature*, **2000**, 405, 298-298

Dans cet exemple, l'activité de l'oligomère est comparée à celle de la magainine, peptide naturel qui agit sur la membrane bactérienne. Pour trois des souches étudiées, l'oligomère montre de meilleurs résultats que la référence. Par contre, le test avec *Escherichia coli* a donné un résultat identique.

L'activité hémolytique du β -peptide a une valeur de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, qui comparée à celle de la melittine ($200 \mu\text{g mL}^{-1}$), est largement plus faible.

Les β -peptides ont relevé une propension à se replier en structures secondaires "foldamères". Par homologie avec les protéines où la fonction est liée à la structure, les foldamères ont montré des activités biologiques intéressantes. Ainsi, Seebach³⁶ *et coll.* ont montré que les β -peptides amphiphiles en forme d'hélices inhibent les apolipoprotéines impliquées dans la consommation et le transport de lipides.

Du fait de leur résistance aux protéases, de leur structuration en édifices moléculaires ordonnés et stables, et de la facilité d'introduction des chaînes latérales, les β -peptides ont un fort potentiel en chimie médicinale.

³⁶ Werder, M. ; Hauser, H. ; Abele, S. ; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, *82*, 1774-1783

II-LES β -PEPTIDES FOLDAMERES

1) Les foldamères

Les foldamères sont des chaînes moléculaires synthétiques qui adoptent une structure secondaire stabilisée par des interactions non-covalentes (type liaison hydrogène, interactions ioniques et dipôle-dipôle). Ces molécules artificielles sont capables de mimer l'habilité des protéines, des acides nucléiques et des polysaccharides à se replier en des conformations très ordonnées, telles que les hélices et les feuillets³⁷.

Les foldamères montrent des propriétés supramoléculaires intéressantes incluant l'auto-assemblage et la reconnaissance moléculaire, ainsi que la reconnaissance substrat-récepteur. De plus, ils sont étudiés en chimie médicinale et ont montré des activités biologiques intéressantes³⁷.

Une définition rigoureuse d'un foldamère a été établie sur une base comportant plusieurs points³⁷ :

- un foldamère est une chaîne moléculaire, ce qui signifie qu'il aura certainement un motif de répétition régulier dans le squelette.
- la chaîne moléculaire doit être oligomérique (de petite taille), par opposition à polymérique (comme les protéines).
- le terme foldamère signifie "structure qui se replie". Il y a donc un caractère dynamique de la conformation, c'est-à-dire, l'action de repliement. Les oligomères où il n'y a pas d'action de repliement, ne sont pas considérés comme des foldamères (Figure 23).

La recherche sur les foldamères a permis de mettre en évidence plusieurs types de repliements ordonnés dans l'espace. La Figure 24 est une illustration des différents types de foldamères rencontrées. Parmi ces structures variées, on trouve classiquement les hélices mono et doubles brin, les feuillets et les coudes. Nous remarquerons au passage, l'existence de foldamères originaux comme les brins célibataires étendus et les hélices mono- et bi-caténares contenant des métaux de coordinations.

³⁷ Hill, D. J. ; Mio, M. J. ; Prince, R. B. ; Hughes, T. S. ; Moore, J. S. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3893-4011

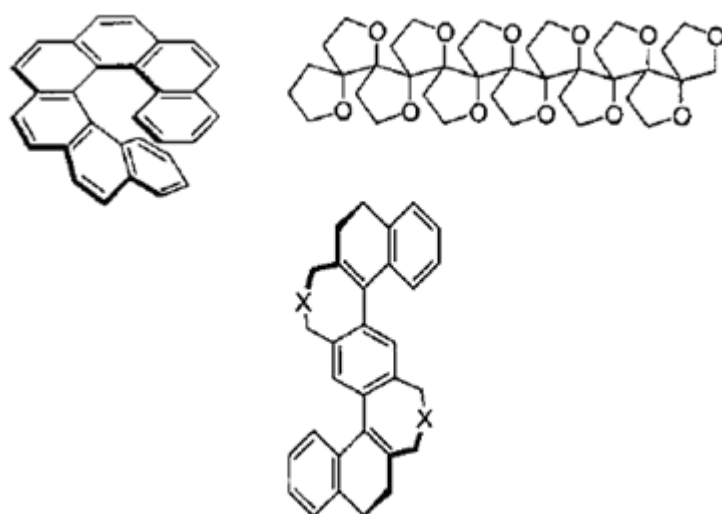


Figure 23³⁷ : exemples de structures polymériques ordonnées, non-foldamères

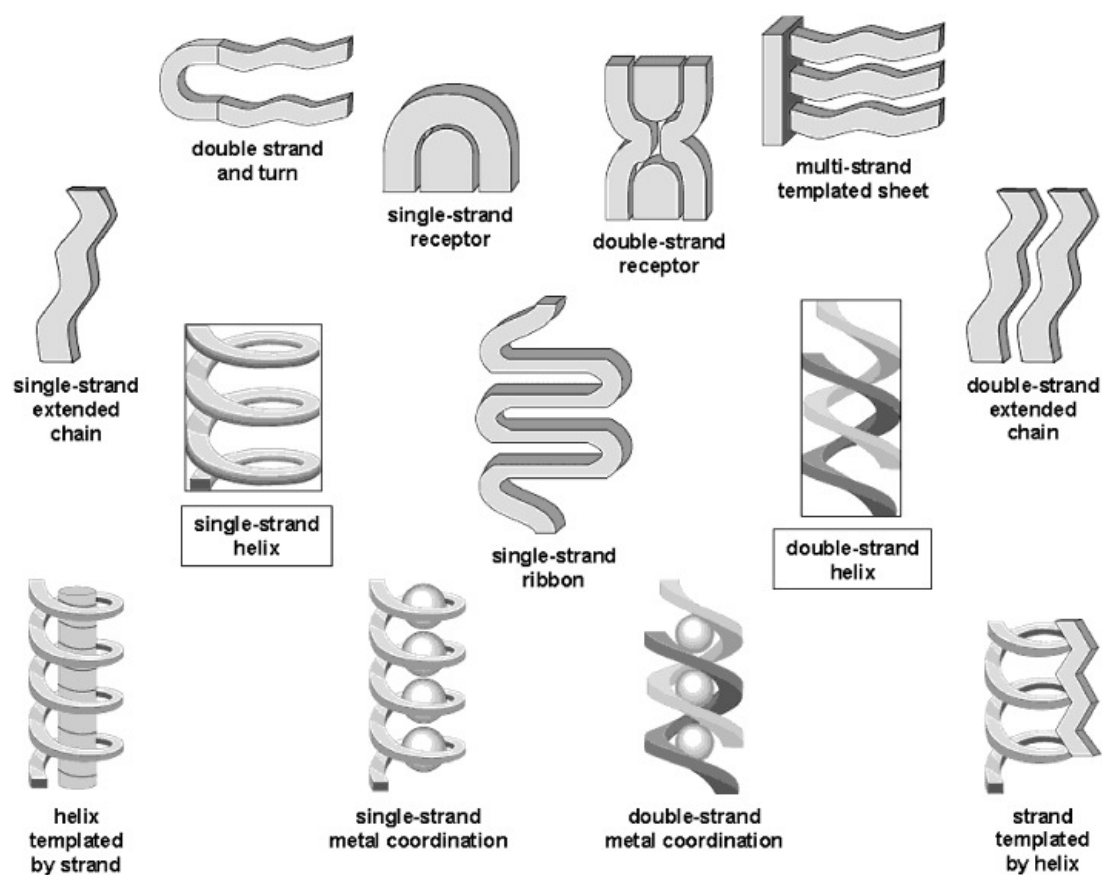


Figure 24³⁷

2) Les structures secondaires dans les β -peptides

En 1996, alors que l'équipe de Seebach étudiait une série de β -oligopeptides pour leur flexibilité, elle a eu la surprise de voir que certains oligomères en solution, se structuraient aisément en hélice³⁸. Ces chercheurs ont pu démontrer par spectroscopie de RMN que de petits peptides constitués au minimum de 6 β -aminoacides, se repliaient en hélice de type 3_{14} . Cette nomenclature signifie que l'hélice possède 3 aminoacides par tour d'hélice et une boucle de 14 atomes inclus dans une liaison hydrogène entre le NH d'amide d'un résidu i et le C=O du carbonyle d'un résidu $i+2$. (Tableau 2). Les lettres P et M entre parenthèses, nous donne une information concernant la direction de l'hélice, respectivement droite et gauche par rapport à l'axe de l'hélice.

Au même moment, l'équipe de Gellman a reporté des structures en hélice 3_{14} et 2.5_{12} , en solution et à l'état solide, pour des oligomères de β -aminoacides cycliques de configuration *trans*^{39,40}. Ces chercheurs ont adopté une nomenclature allégée, ne tenant compte que du nombre d'atomes inclus dans la boucle de l'hélice : typiquement, l'hélice-12 et l'hélice-14 (Tableau 2).

Boucle d'hélice	Seebach	Gellman
14	(P) 3_{14}	14
	(M) 3_{14}	14
12	(P) 2.5_{12}	12
	(M) 2.5_{12}	12

Tableau 2

Les travaux de ces deux groupes ont été le point de départ de l'exploration conformationnelle des β -peptides. Ainsi, selon le type de β -aminoacides utilisés (β^3 et/ou β^2 , mono et/ou disubstitués, cycliques et/ou ouverts), les oligomères peuvent adopter des structures secondaires variées. A ce jour, plusieurs types d'hélices, de feuillets parallèles et antiparallèles et de coudes β ont été décrits⁴¹.

³⁸ a) Seebach, D. ; Kühne, F. N. M. ; Overhand, M. ; Martinoni, B. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 913-941, b) Seebach, D. ; Ciceri, P. E. ; Overhand, M. ; Widmer, H. *Helv. Chim. Acta* **1996**, 79, 2043-2066

³⁹ Appella, D. H. ; Christianson, L. A. ; Karle, I. L. ; Powell, D. R. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 6206-6212

⁴⁰ Appella, D. H. ; Christianson, L. A. ; Klein, D. A. ; Richards, M. R. ; Powell, D. R. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 7574-7581

⁴¹ Seebach, D. ; Hook, D. F. ; Glätti, A. *Biopolymers*, **2006**, 84, 23-37

a) La formation des hélices et des feuillets

La formation des hélices et des feuillets dans les β -peptides est directement définie à l'échelon local, *i.e.* liée à l'état conformationnel de l'acide aminé. Plus précisément, l'homologation formelle des α -aminoacides en β -aminoacides introduit un degré supplémentaire de libre torsion, l'angle θ défini par l'angle dièdre supplémentaire N-C $_{\beta}$ -C $_{\alpha}$ -C(O). Il existe donc un ensemble de trois angles de torsion ϕ , ψ et θ pour décrire la conformation locale de chaque résidu et par conséquent la conformation globale du peptide⁴² (Figure 25a).

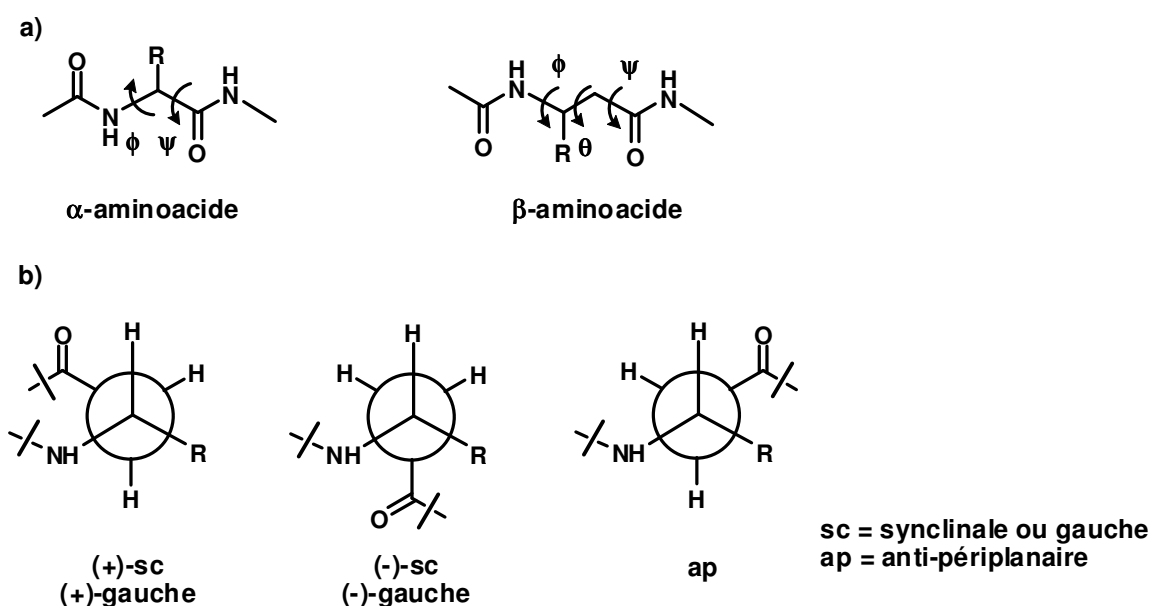


Figure 25

Prenons l'exemple d'un résidu β^3 -aminoacide inclus dans un peptide. La courbe d'énergie potentielle en fonction de l'angle θ est de type butane classique. Les conformères décalés sont favorisés par rapport aux conformères éclipsés (Figure 25b). Cependant, parmi les 3 conformères décalés, un seul montre un profil énergétique minimum basé sur des interactions stériques et électroniques réduites. Il s'agit de la conformation (+)-synclinale qui oriente le groupement R entre deux hydrogènes du carbone adjacent. Cette conformation locale θ répétée sur chaque résidu du peptide est une caractéristique pour la formation d'hélices dans les β -peptides.

Si nous observons la conformation locale des différents β^2 -, β^3 - et *syn*- $\beta^{2,3}$ -aminoacides, nous pouvons voir que la conformation synclinale est favorisée pour chacun de ces résidus (Figure 26).

⁴² Cheng, R. P. ; Gellman, S. H. ; De Grado, W. *Chem. Rev.* **2001**, 101, 3219-3232

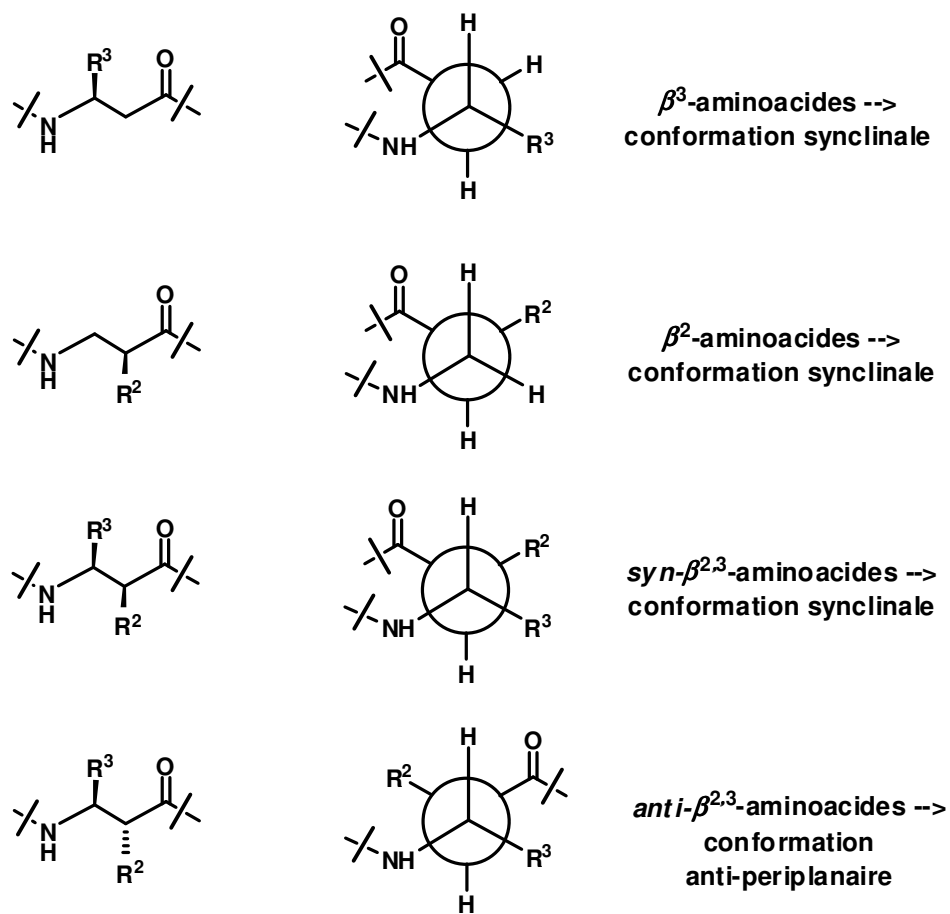


Figure 26

De plus, lorsque nous regardons par exemple une hélice-14 (Figure 27), nous pouvons voir que les substituents de chaque résidu se retrouvent en position latérales par rapport à l'axe de l'hélice. De cette façon, les interactions stériques sont minimisées en son sein.

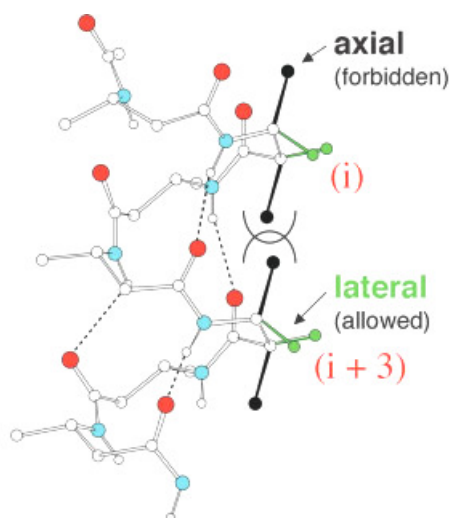


Figure 27

Il existe une exception pour les $\beta^{2,3}$ -aminoacides de configuration relative *anti* qui vont favoriser la conformation *anti*-périplanaire et par conséquent l'absence d'hélice (cf. figure 26). Effectivement, si l'angle dièdre θ adopte une conformation synclinale, cela va engendrer une gêne stérique des substituants en C_2 - C_3 (Figure 28) et des substituants axiaux en $i, i+3$ d'autre part de l'hélice (cf. figure 27).

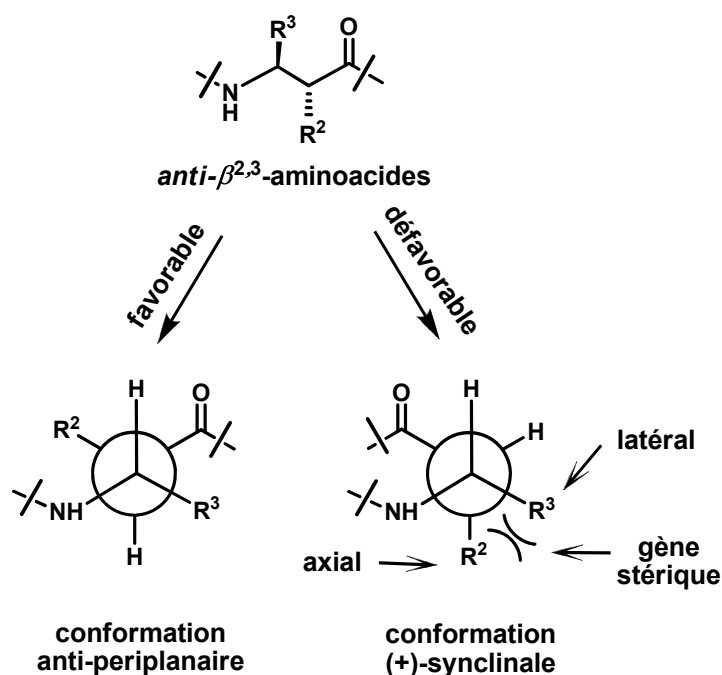


Figure 28

Cette configuration relative des *anti*- $\beta^{2,3}$ -aminoacides entraîne plutôt la formation d'une structure secondaire de type feuillet β (Figure 29).

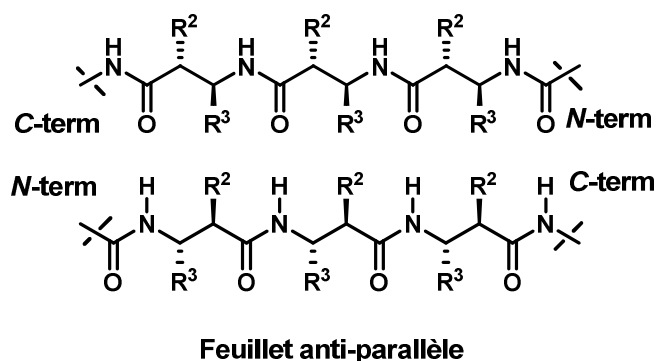


Figure 29

Pour les mêmes considérations conformationnelles, les oligomères de $\beta^{2,2}$ -aminoacides et $\beta^{3,3}$ -aminoacides ne forment pas d'hélice, contrairement aux dialcyles- α -aminoacides comme l'aminoacide 2,2-diméthylglycine (aminoacide isobutyrique, Aib) (Figure 30)³.

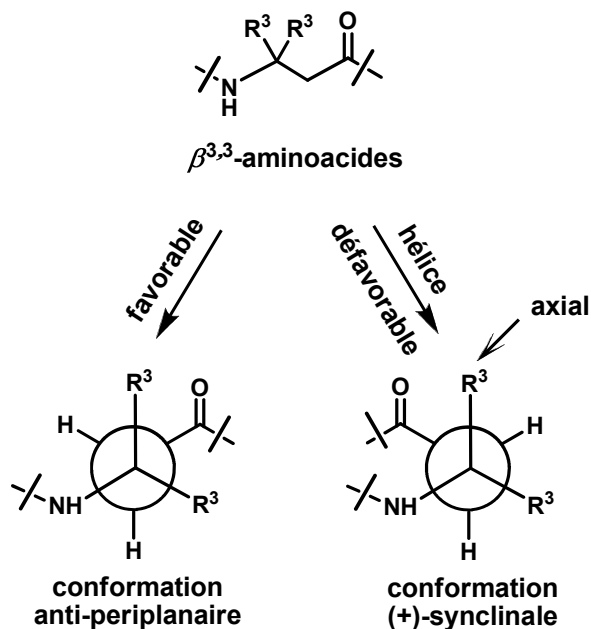


Figure 30

Par une analyse qualitative des conformations, on peut prédire la préférence de structures secondaires de β -peptides diversement substitués. Des arrangements en hélice ou en coude nécessitent une conformation synclinale (-sc/+sc), alors qu'une conformation *anti*-périplanaire autour de la liaison C_2-C_3 favorise la formation de structures en feuillets.

Donc, pour appliquer une valeur particulière à l'angle θ , il suffit d'incorporer la liaison $C_\alpha-C_\beta$ (C_2-C_3) dans un cycle. Cela a été démontré pour le cyclopentane, le cyclohexane et leurs dérivés, où il a été observé que la taille du cycle déterminait le type d'hélice formée.

b) Les hélices

Dans cette description des hélices, nous adopterons la nomenclature définie par Gellman.

Bien qu'il soit possible d'envisager plusieurs types d'hélices articulées autour de liaisons hydrogènes $C=O \cdots H-N$ entre un couple de résidus ($i, i \pm n$), seules six structures distinctes ont été identifiées jusqu'ici dans le domaine des β -peptides. Ce sont l'hélice-14, l'hélice-12, l'hélice-10, l'hélice-12/10 et l'hélice-8 (Figure 31).

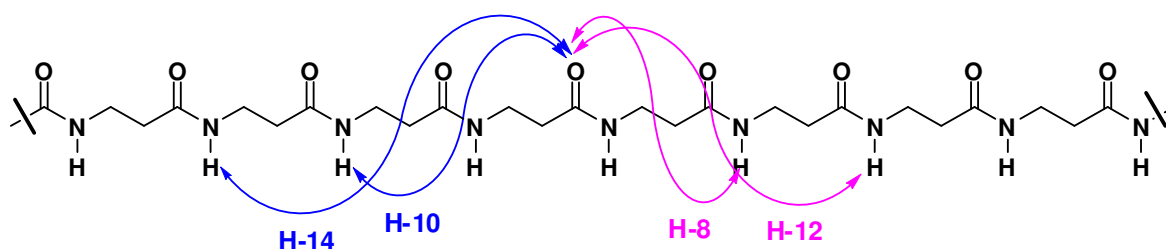


Figure 31

* L'hélice-14

L'hélice-14 est la plus représentée dans le monde des β -peptides puisqu'elle est adoptée, soit par des enchaînements de β^2 -aminoacides, de β^3 -aminoacides, ou de *syn*- $\beta^{2,3}$ -aminoacides de même configuration absolue³. Elle est caractérisée par une boucle de 14 atomes entre le N-H d'un résidu (i) et le C=O d'un résidu (i+2). Le sens de la liaison hydrogène N-H--O=C dans ce type d'hélice va de la partie N-terminale vers la partie C-terminale (Figure 32).

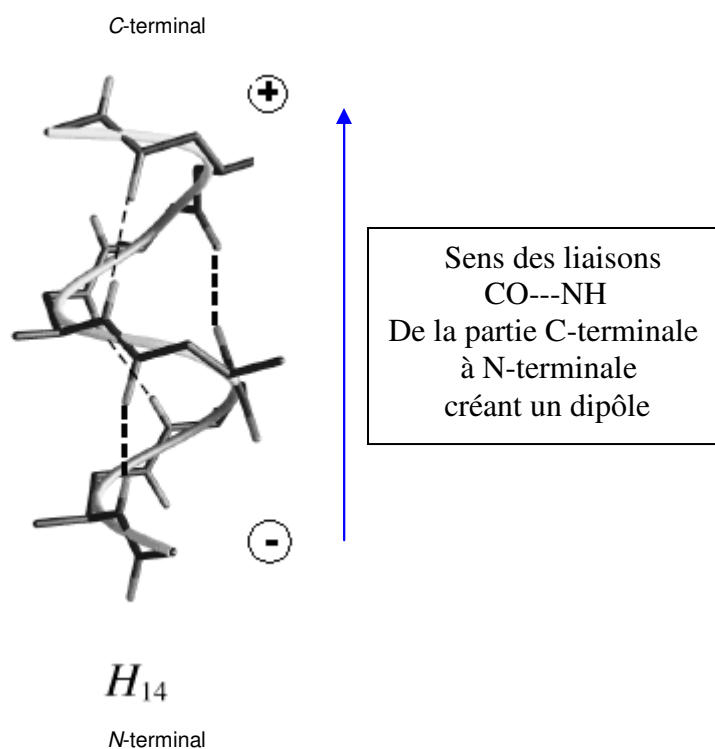


Figure 32

Seebach a été le premier à observer la formation d'une hélice-14 à partir de l'hexa- β -peptide $\text{NH}^{3+}\text{-}\beta^3\text{-hVal-}\beta^3\text{-hAla-}\beta^3\text{-hLeu-}\beta^3\text{-hVal-}\beta^3\text{-hAla-}\beta^3\text{-hLeu-OH}$, constitué d'aminoacides de configuration (S) (Figure 33)³⁸.

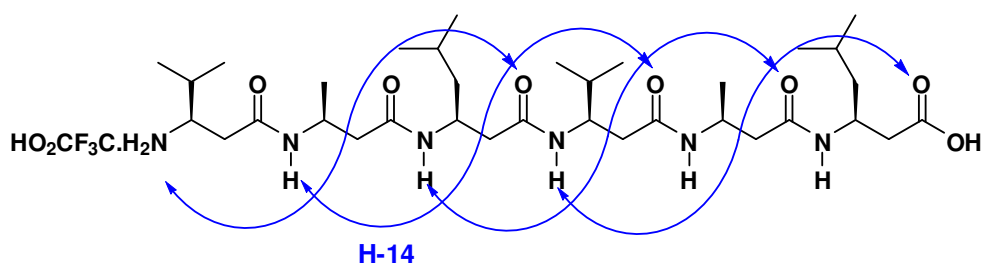


Figure 33

Gellman a étudié le repliement des oligomères du (*R,R*)- ou (*S,S*)-*trans*-ACHC pour aboutir à la formation d'une hélice-14 fortement stabilisée par le cycle³⁹ (Figure 34). En effet, la contrainte conformationnelle apportée par le cycle favorise encore plus la structuration de l'hélice. La figure 35 est une représentation de l'oligomère de *trans*-ACHC structuré en hélice-14. Lorsque l'on observe chaque résidu, nous voyons très bien la conformation synclinale bloquée à l'échelle du résidu.

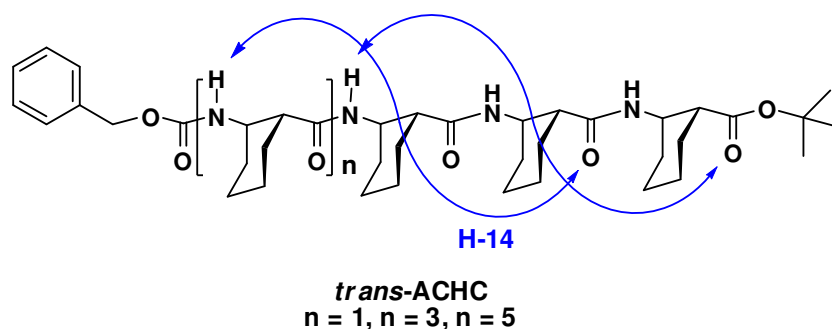


Figure 34

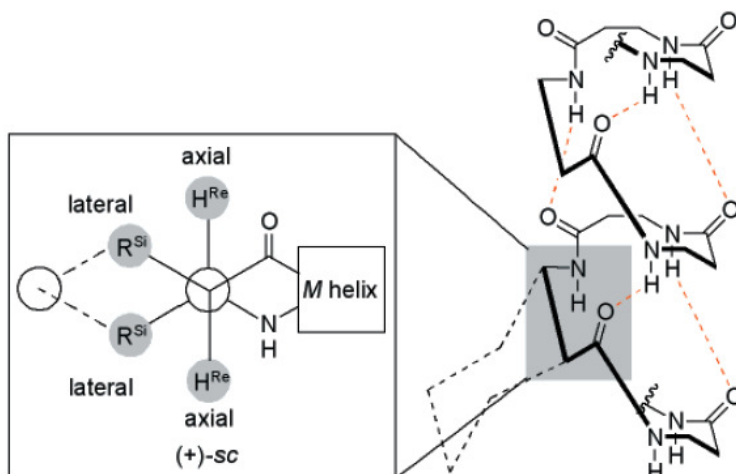


Figure 35³⁷

* L'hélice-12

Gellman a mis en évidence la singularité de l'hélice-12 qui n'est observée que pour les oligomères de β -aminoacides alicycliques, à 5 chaînons et de configuration *trans*. Effectivement, un enchaînement de résidus β -*trans*-aminoacides de type cyclopentane, pyrrolidine et leurs dérivés, fournissent une hélice-12^{40,43} (Figure 36).

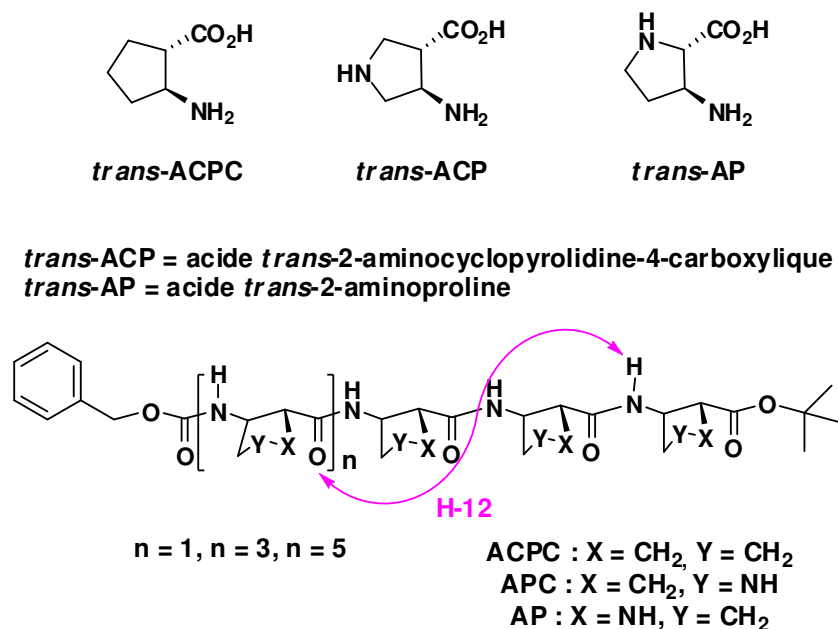


Figure 36

Ainsi, l'octamère du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACPC, une hélice-12 a été observée⁴⁰ (Figure 37). Dans cet exemple, la conformation de la liaison C₂-C₃ peut évoluer entre la conformation (–)-synclinale (– 80 °) et (–)-anticlinale (– 150 °). Cependant, la conformation (–)-synclinale est privilégiée pour des liaisons hydrogène de type hélice-12.

⁴³ Bayard, R. ; Gellman, H. ; Gellman, S. H. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 3353-3362

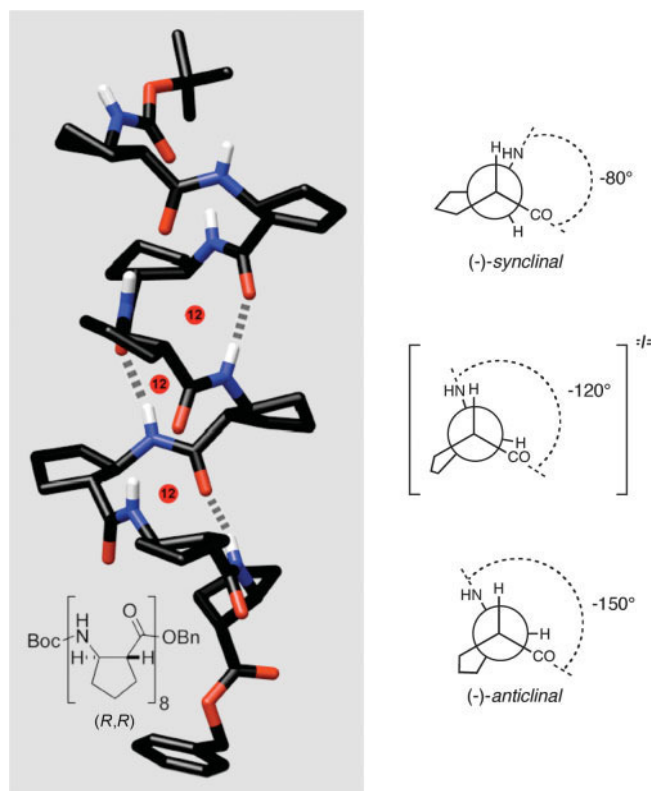
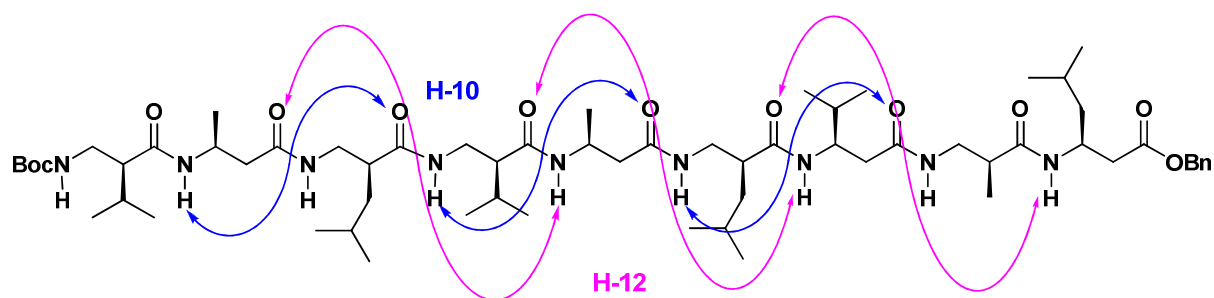


Figure 37⁴¹

* L'hélice-10/12

Bien que les oligomères de (*S*)- β^3 -aminoacides ou de (*S*)- β^2 -aminoacides forment une hélice-14, un enchaînement alterné de résidus (*S*)- β^2 - et (*S*)- β^3 -aminoacides conduit à la formation d'une hélice-10/12 alternée⁴⁴. Seebach a été le premier à mettre en évidence ce type d'hélice sur le nonamère Boc- β^3 -hVal- β^2 -hAla- β^3 -hLeu- β^2 -hVal- β^3 -hAla- β^2 -hLeu- β^3 -hVal- β^2 -hAla- β^3 -hLeu-OBn (Figure 38). Cette hélice suit une alternance de boucles à 12 et 10 atomes et la conformation locale du dièdre θ reste de type synclinal. Cette alternance de boucles est due aux deux d'angles dièdres φ et ψ qui adoptent des valeurs propices à cette structuration.

Encore plus remarquable, ce type de β -peptides ne possède pas de macrodipôle résultant, puisque les liaisons C=O et N-H ont un sens alterné nord/sud par rapport à l'axe de l'hélice.



⁴⁴ Seebach, D. ; Abele, S. ; Gademann, K. ; Richard, G. ; Hintermann, T. ; Jaun, B. ; Matthews, J. L. ; Schreiber, J. B. *Helv. Chem. Acta* **1998**, *81*, 932-982

Figure 38

* L'hélice-10

Ce modèle de repliement de β -peptides a été récemment observé sur un tétramère de β -aminoacides (*R,R*)- ou (*S,S*)-*trans*-ACHC en solution, et non protégé sur la partie *N*-terminale⁴⁵ (Figure 39). Il est intéressant de noter que l'hexamère et l'octamère correspondants forment une hélice-14.

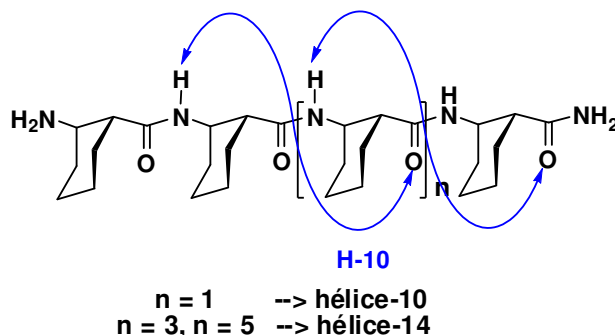


Figure 39

L'existence d'une hélice-10 pour des oligomères dérivés de l'acide *cis*-2-aminooxétane-2-carboxylique a été également reportée⁴⁶ (Figure 40). Dans cet exemple, la particularité de l'oligomère est liée à la configuration relative *cis* du cycle oxétane, car jusqu'à ce moment, les β -aminoacides alicycliques étaient de configuration *trans*.

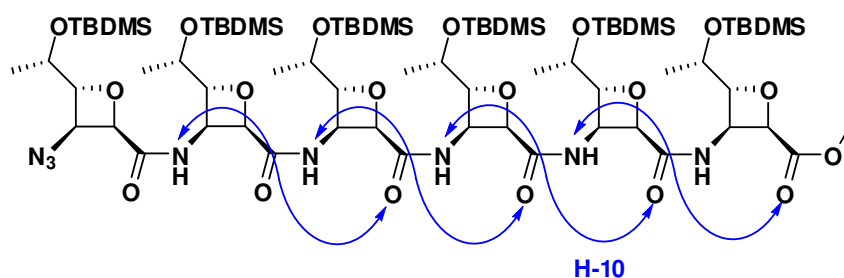


Figure 40

* L'hélice-8

L'hélice-8 a été observée sur deux enchaînements moléculaires. Le premier concerne des oligopeptides de l'acide 1-aminocyclopropanecarboxylique⁴⁷ (Figure 41). Ce type d'hélice a un arrangement en escalier où chaque marche se compose d'un pas d'hélice à 8 atomes.

⁴⁵ Hetenyi, A. ; Mandity, I. M. ; Martinek, T. A. ; Toth, G. K. ; Fulop, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2005**, 127, 547-553

⁴⁶ Claridge, T. D. ; Goodman, J. M. ; Taillefumier, C. ; Watterson, M. P. ; Fleet, G. W. *J. Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 4251-4255

⁴⁷ Abele, S. ; Seiler, P. ; Seebach, D. *Helv. Chim. Acta* **1999**, 82, 1559-1571

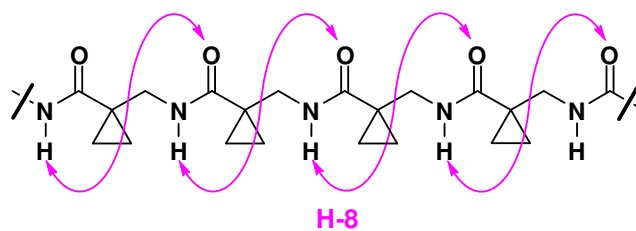


Figure 41

Des oligomères de β^3 -aza- et β^3 -oxa-aminoacides^{48,49} ont également montré une propension à se replier en hélice-8. Dans ce type d'aminoacide, le carbone en β est substitué par un atome d'azote ou d'oxygène. C'est le cas de l'hexapeptide de β^3 -aza-aminoacides *N*-substitués qui se structure en hélice-8 (Figure 42)⁴⁹.

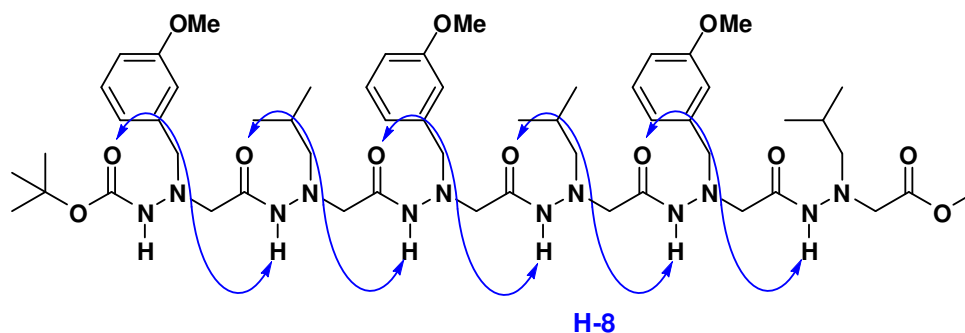
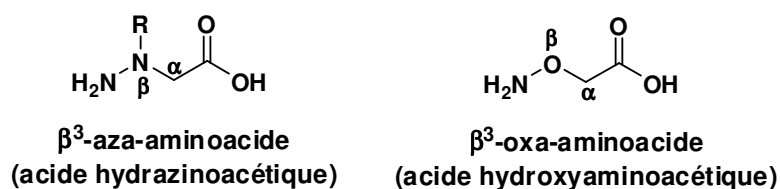


Figure 42

* Hélices chimériques

Les hélices chimériques sont formées par des oligomères constitués à la fois de β -aminoacides et d' α -aminoacides. La combinaison en alternance de ces deux types d'aminoacides a fourni de nouvelles structures en hélices alternées. Gellman a montré la formation d'une hélice chimérique de type 11/11/12 à partir d'un heptamère décrit dans la figure 43⁵⁰.

⁴⁸ a) Cheguillaume, A. ; Salaun, A. ; Sinbandhit, S. ; Potel, M. ; Gall, P. ; Baudy-Floch, M. ; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 4923-4929, b) Salaun, A. ; Potel, M. ; Roisnel, T. ; Gall, P. ; Le Grel, P. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 6499-6502

⁴⁹ Yang, D. Y. ; Qu, J. ; Li, B. ; Ng, F. F. ; Wang, W. C. ; Cheung, K-K. ; Wang, D-P. ; Wu, Y-D. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, 121, 589-590

⁵⁰ Schmitt, M. A. ; Choi, S. H. ; Guzei, I. A. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 4538-4539

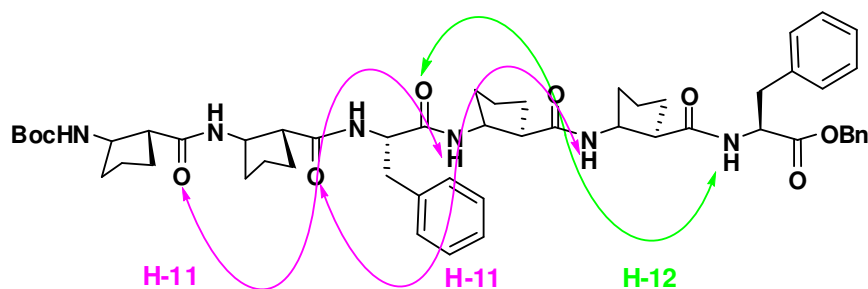


Figure 43

c) Les feuillets

Les structures secondaires en feuillets sont souvent obtenues à partir d'oligomères de $\beta^{2,3}$ -aminoacides de configuration *anti*. Cette configuration relative empêche la formation d'hélice au profit de structures en feuillets, stabilisées par un réseau de liaisons hydrogènes. Il existe deux types de feuillet : parallèles et antiparallèles (Figure 44a et 44b). La distinction entre les types de feuillets se fait selon la direction que prend chaque brin peptidique.

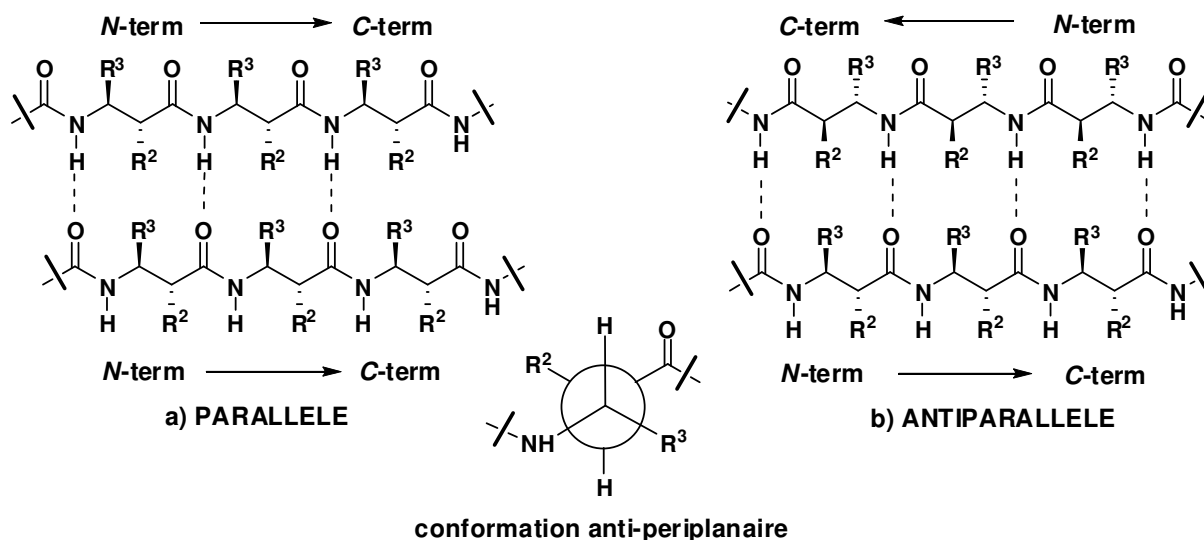
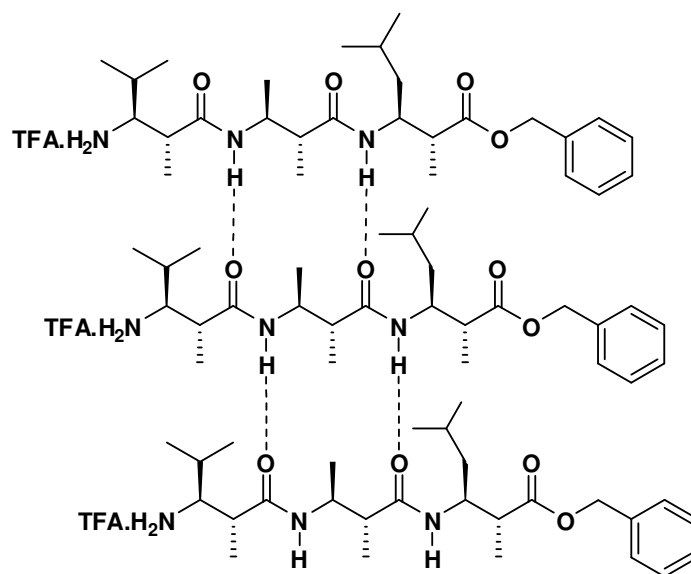


Figure 44

Seebach *et coll.* ont décrit l'empilement en feuillet d'un enchaînement peptidique de 3 résidus *anti*- $\beta^{2,3}$ -aminoacides (Figure 45)⁵¹. Cet empilement est de type feuillet parallèle.

⁵¹ Seebach, D. ; Abele, S. ; Gademann, K. ; Jaun, B. *Angew. Chem. Int. Ed.* **1999**, 38, 1595-1597

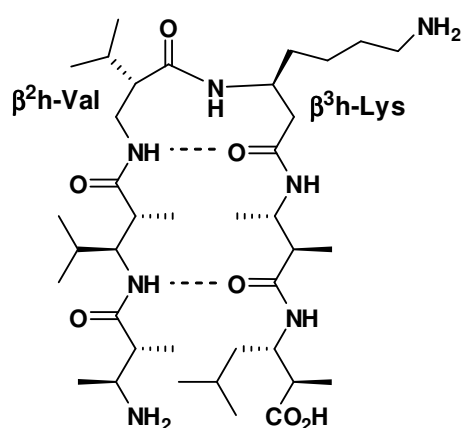


PARALLELE

Figure 45

d) Les coudes

Le repliement en coude est une structure secondaire de type feuillet antiparallèle intramoléculaire. Seebach *et coll.* a décrit ce type d'arrangement secondaire dans lequel le coude est formé par la β^3 h-Lys et la β^2 h-Val (Figure 46)⁵¹. Ensuite, le feuillet antiparallèle intramoléculaire se forme par un jeu de liaisons hydrogènes entre les résidus $\beta^{2,3}$ -aminoacides de la chaîne peptidique.



coude

Figure 46

3) Les β -peptides oligomères des β -aminoacides cycliques

Lorsque l'on s'intéresse de plus près aux oligomères de β -aminoacides cycliques, on constate qu'un travail significatif a été réalisé dans ce domaine. Nous détaillerons par la suite, les foldamères observés pour les différentes tailles de cycles.

- cycle à 6 chaînons (ACHC et dérivés)

Gellman *et coll.* ont largement contribué à étoffer ce domaine, notamment avec les oligomères de *trans*-ACHC et ses dérivés^{39,52,53}. Ces chercheurs ont observé la formation d'une hélice-14 consolidée par l'apport de la contrainte de cycle. Mais lorsque les résidus *trans*-ACHC étaient substitués par des β -aminoacides linéaires de type β^2 h-Lys, l'hélice perdait inévitablement en stabilité (Figure 47). Il est intéressant de constater qu'aucune étude n'a été réalisée sur les oligomères du *cis*-ACHC.

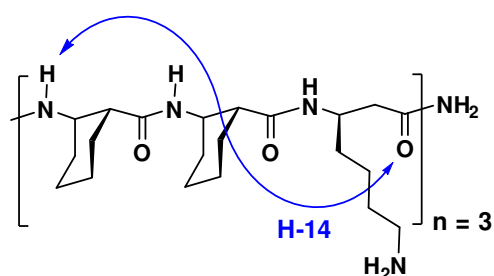


Figure 47

- cycle à 5 chaînons (ACPC et dérivés)

Gellman *et coll.* ont également étudié des séries d'oligomères de β -aminoacides alicycliques à 5 chaînons et de configuration relative *trans*. Aux termes de leurs études, ils ont mis en évidence la formation d'un autre type d'hélice, l'hélice-12^{43,44,54} (Figure 48). Cette hélice est restée unique, puisqu'à ce jour, aucun autre enchaînement de β -aminoacides ou un quelconque oligomère n'a permis d'observer l'hélice-12.

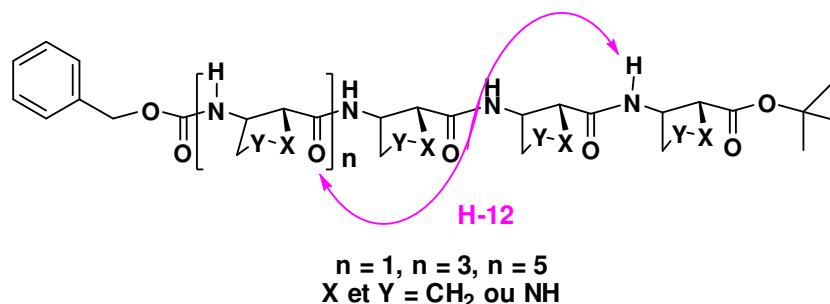


Figure 48

⁵² Schinner, M. ; Murray, J. K. ; Langenhan, J. L. ; Gellman, S. H. *Eur. J. Org. Chem.* **2003**, 721-726

⁵³ Raguse, T. L. ; Porter, E. A. ; Weisblum, B. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12774-12785

⁵⁴ Peelen, T. J. ; Chi, Y. ; Payne, E. ; Gellman, S. H. *Org. Lett.* **2004**, 6, 4411-4414

Fülöp *et coll.*, travaillant sur les β -aminoacides cyclopentaniques de configuration *cis* et *trans*, ont observé trois phénomènes de structuration distincts selon la nature de la chaîne. Lorsque l'oligomère d'ACPC est composé uniquement par le *cis*-(1*S*,2*R*)-ACPC, ils ont observé une structuration de type brin⁵⁵ (Figure 49a). Par contre, lorsque l'oligomère est composé d'une alternance des énantiomères *cis*-(1*S*,2*R*)- et *cis*-(1*R*,2*S*)-ACPC, les résultats de l'analyse conformationnelle ont montré la formation d'une hélice-10/12⁵⁶ (Figure 49b). Ces auteurs ont réalisé une étude sur l'alternance des énantiomères du *trans*-(1*R*,2*R*)- et *trans*-(1*S*,2*S*)-ACPC pour observer une structuration en feuillet β ⁵⁶ (Figure 49c).

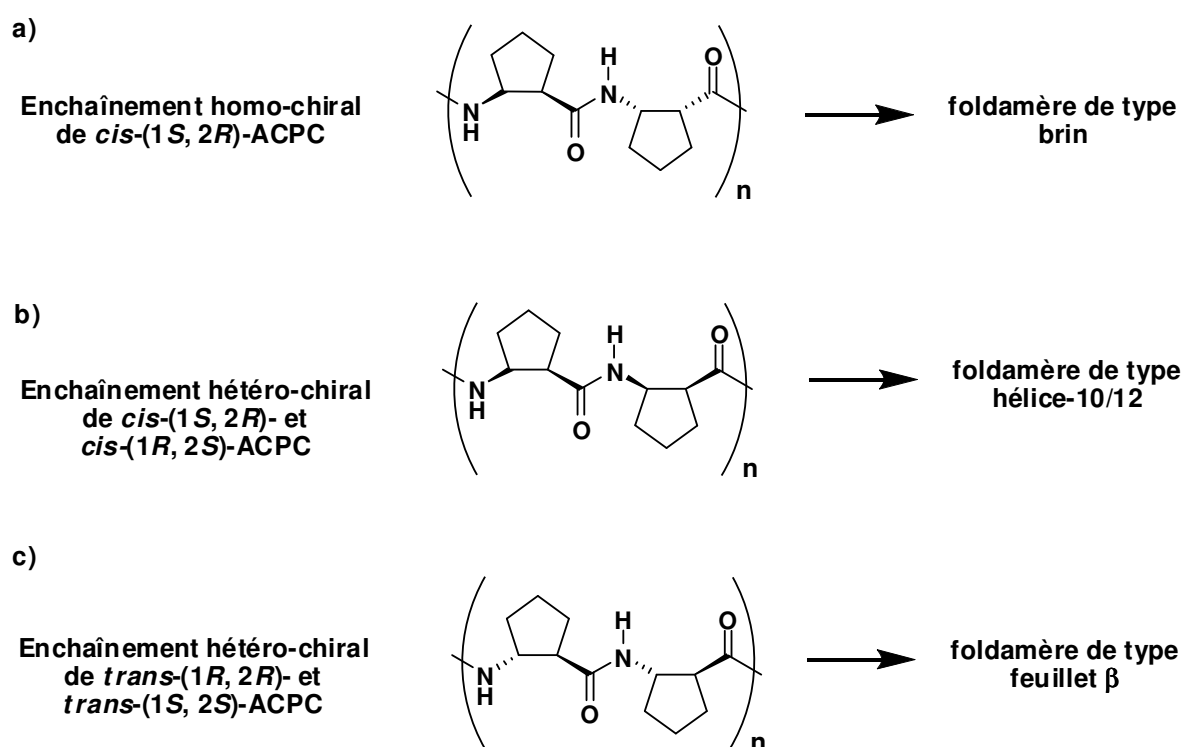


Figure 49

- cycle à 4 chaînons (ACBC et dérivés)

Fleet *et coll.* ont été les premiers à s'intéresser aux cycles à 4 chaînons en étudiant des oligomères de dérivés *cis*-oxétane⁴⁶. L'analyse conformationnelle de plusieurs β -peptides à révéler une propension à la structuration en hélice-10 (*cf.* Figure 40).

⁵⁵ Martinek, T. ; Mandity, I. M. ; Fülöp, L. ; Tóth, G. ; Vass, E. ; Hollösi, M. ; Forró, E. Fülöp, F. *J. Am. Chem. Soc.* **2006**, 128, 13539-13544

⁵⁶ Martinek, T. ; Tóth, G. ; Vass, E. ; Hollösi, M. ; Fülöp, F. *Angew. Chem. Int. Ed.* **2002**, 41, 1718-1721

Très peu de travaux ont été recensés dans le domaine des oligomères de l'acide aminé cyclobutanique. Ortuño et *coll.* ont mené une étude conformationnelle sur deux tétramères contenant le *cis*-(1*S*,2*R*)-ACBC. L'analyse conformationnelle du tétrapeptide [*cis*-(1*S*,2*R*)-ACBC-β-Ala]₂ a permis d'identifier une structuration en hélice-14⁵⁷ (Figure 50a). Le second tétrapeptide composé uniquement de résidus (1*S*,2*R*)-ACBC adopte une structuration en brin⁵⁸, comme Fülöp l'avait observé dans l'homo-oligomère du (1*S*,2*R*)-ACPC (Figure 50b).

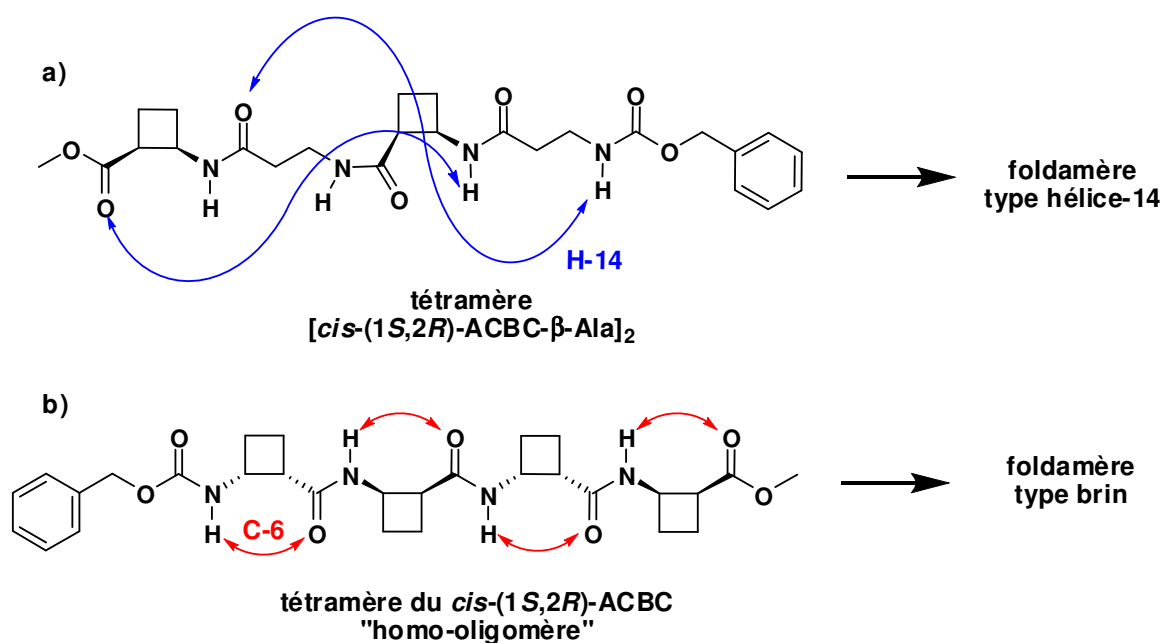


Figure 50

⁵⁷ Izquierdo, S. ; Kogan, M. J. ; Parella, T. ; Moglioni, A. G. ; Branchadell, V. ; Giralt, E. ; Ortuño, M. R. *J. Org. Chem.* **2004**, *69*, 5093-5099

⁵⁸ Rúa, F. ; Boussert, S. ; Parella, T. ; Díez-Pérez, I. ; Branchadell, V. ; Giralt, E. ; Ortuño, M. R. *Org. Lett.* **2007**, *18*, 3643-3645

III-OBJECTIFS DE CE TRAVAIL

Des travaux de recherche ont été réalisés sur des oligomères de β -aminoacides cycliques de type cyclohexane (ACHC), cyclopentane (ACPC), oxétane et cyclobutane (ACBC). Sur ce dernier cycle, aucune publication ne fait état de la synthèse et l'étude conformationnelle d'oligomères du *trans*-ACBC. Cela s'explique très simplement par le fait qu'au début des travaux décrits dans ce mémoire, il n'y avait aucune synthèse du *trans*-ACBC sous forme énantiomériquement enrichie.

Les objectifs du travail de cette thèse ont été définis de la manière suivante :

Mettre au point des voies de synthèse des énantiomères optiquement purs du *trans*-ACBC, lesquels n'ont jamais été synthétisés.

Préparer le dimère, le tétramère, l'hexamère et l'octamère du *trans*-ACBC énantipur.

Utiliser différentes techniques pour la détermination de structure et de conformation sur cette série d'oligomères. Cette dernière étape, permettrait de déterminer la présence d'une structure secondaire régulière, donc de savoir si les oligomères du *trans*-ACBC sont des foldamères (Figure 51).

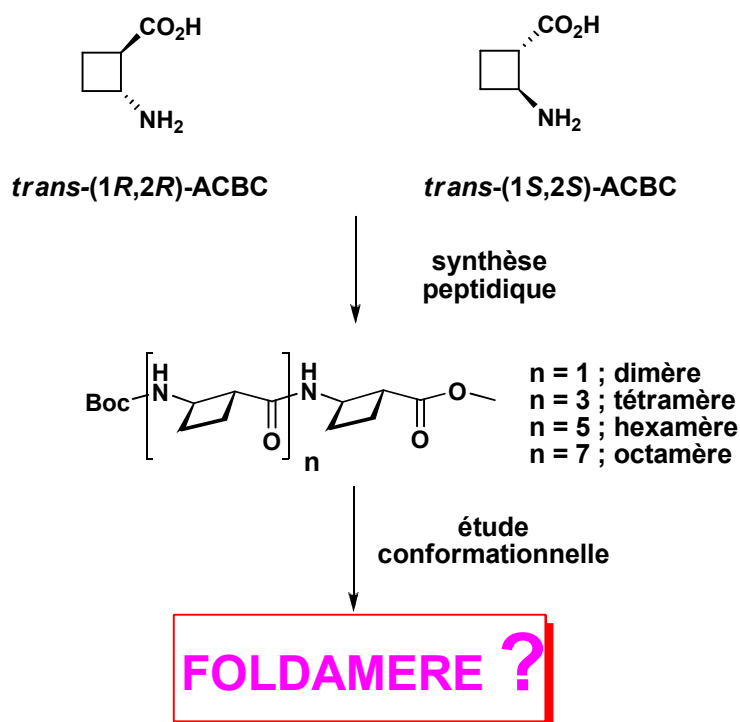


Figure 51

RESULTATS ET
DISCUSSION : *PREMIERE*
PARTIE - SYNTHESE

I-SYNTHESE DE β -AMINOACIDES

ALICYCLIQUES : RAPPELS

BIBLIOGRAPHIQUES

Dans la littérature, il existe de nombreuses méthodes de synthèse diastéréosélectives et énantiosélectives de β -aminoacides. Cependant, l'essor de certaines méthodes est limité à un seul type β -aminoacides, le plus souvent non cyclique⁵⁹.

Dans cette partie, nous détaillerons les stratégies utilisées pour accéder aux β -aminoacides alicycliques. Tout d'abord, nous commencerons par une revue des stratégies utilisées pour les cycles à 6 et 5 chaînons. Le nombre de méthodes développées pour accéder à ce type de β -aminoacide est relativement élevé, conséquence de la grande disponibilité de dérivés cyclohexaniques et cyclopentaniques.

Nous verrons la synthèse des β -aminoacides bicycliques et à cycle moyen, bien qu'il y ait peu de synthèses décrites dans la littérature en raison de la faible disponibilité de leurs dérivés.

Nous finirons avec les cycles à 4 et 3 chaînons pour lesquels il y a également peu de méthodes disponibles en raison de la stabilité de ces cycles tendus.

1) β -Aminoacides à 5 et 6 chaînons

Parmi les β -aminoacides carbocycliques, les dérivés les plus étudiés sont ceux à 5 et 6 chaînons (Figure 52).

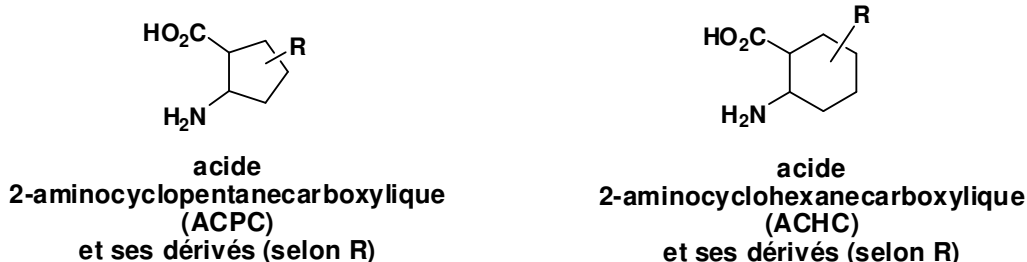


Figure 52

⁵⁹ Liu, M. ; Sibi, M. *Tetrahedron* **2002**, *58*, 7991-8035

a) Réarrangements de dérivés d'acides 1,2 dicarboxyliques

Le réarrangement de type Hofmann est utilisé pour convertir un acide carboxylique en amine primaire ou en carbamate. Certains auteurs rapportent la synthèse de β -aminoacides alicycliques de configuration relative *cis* en utilisant le réarrangement d'Hofmann.

i) Version racémique

Plieninger et Schneider ont été les premiers à décrire l'accès aux *cis*-ACPC et *cis*-ACHC racémiques, (\pm)-*cis*-1 et (\pm)-*cis*-2 respectivement, à partir des anhydrides cycliques correspondants⁶⁰ (Schéma 1). L'anhydride **3** subit d'abord une réaction d'aminolyse par l'action d'ammoniaque. Ensuite, l'addition de dibrome et de soude permet le réarrangement de la fonction amide de (\pm)-**4** en isocyanate intermédiaire (\pm)-**5**. L'hydrolyse de celui-ci forme l'acide carbamique instable qui se décarboxyle pour conduire au *cis*-ACPC (\pm)-**1** avec un rendement globale de 44 % (Schéma 1a). L'anhydride **6** est traité de la même manière que l'anhydride **3**, avec une étape supplémentaire pour réduire l'insaturation du cyclohexène (\pm)-**7**, déjà présente sur l'anhydride de départ. Ainsi, le *cis*-ACHC (\pm)-**2** a été obtenu avec un rendement global de 50 % (Schéma 1b).

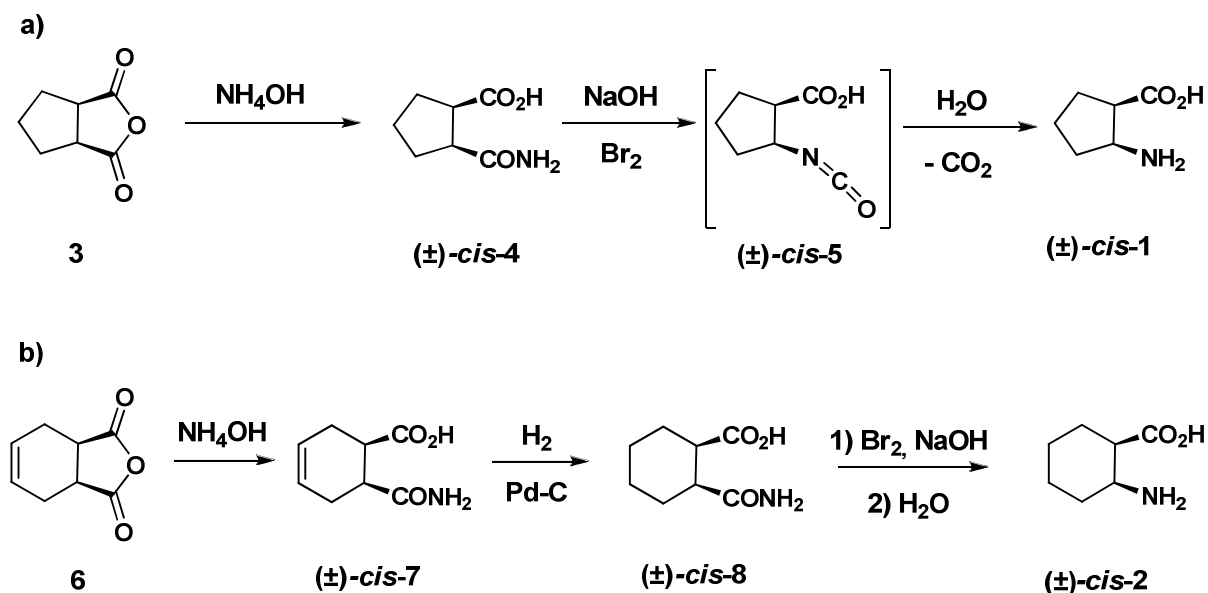


Schéma 1

⁶⁰ Plieninger, H. ; Schneider, K. *Chem. Ber.* **1959**, 1594-1599

ii) Version énantiosélective

Berkessel *et al.* ont mis au point une méthode d'accès aux énantiomères du *trans*-ACHC optiquement purs à partir du racémique (\pm)-**9**⁶¹. Celui-ci subit un dédoublement cinétique en présence d'un équivalent de l' α -méthylbenzylamine (-)-**10** pour fournir chaque énantiomère avec un rendement de 40 % et un excès énantiomérique supérieur à 99 %. A partir de ces composés énantipurs et par une réaction one-pot comprenant, la déshydratation du diacide, l'aminolyse puis la dégradation d'Hofmann, ces auteurs ont préparé les aminoacides *trans*-(+)-**2** et *trans*-(-)-**2** avec un rendement de 74 % et des excès énantiomériques conservés (Schéma 2).

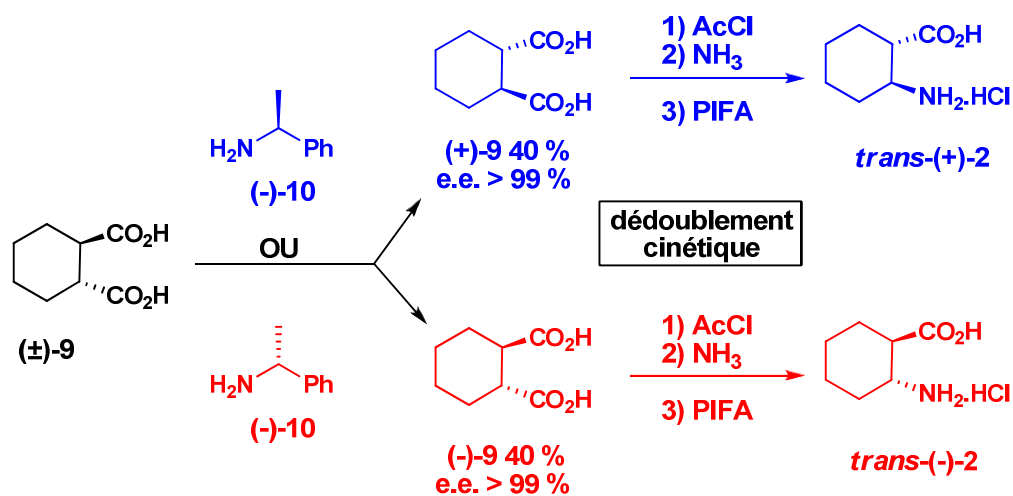


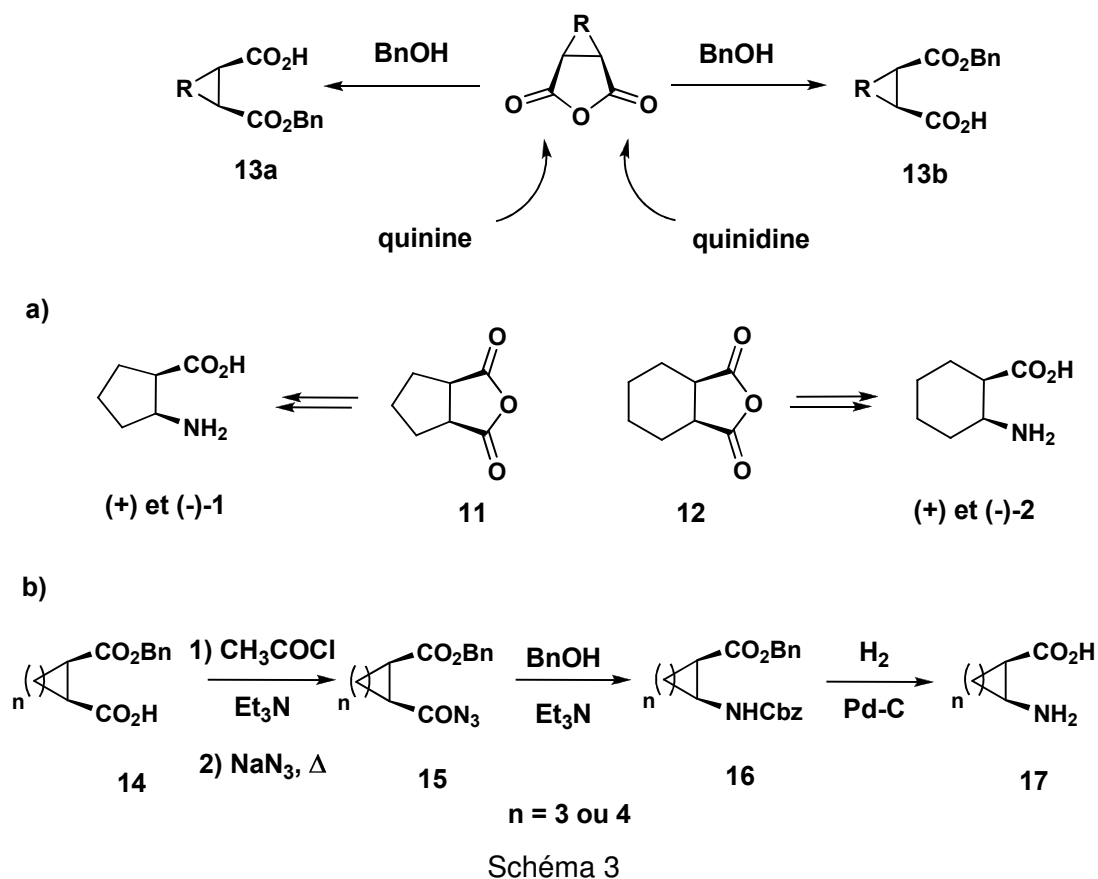
Schéma 2

Le réarrangement de Curtius est une autre méthode qui permet d'accéder aux β -aminoacides à partir des dérivés 1,2-dicarboxyliques. Bolm *et al.* ont utilisé cette méthode sur des dérivés d'acides 1,2-dicarboxyliques optiquement purs, obtenus par la désymétrisation organocatalysée d'anhydride *méso* (Schéma 3). Ainsi, selon le choix de la base chirale, ils ont pu accéder aux deux énantiomères optiquement enrichis de **1** et **2** à partir des composés *méso* **11** et **12** (Schéma 3a)⁶².

Selon le schéma général (Schéma 3b), les auteurs ont préparé les hémiesters **14** dérivés des anhydrides **13a et b** avec des rendements compris entre 74 et 99 % et des excès énantiomériques supérieurs à 97 %. Ceux-ci ont été ensuite transformés en azotures d'acyle **15** qui, chauffés en présence d'alcool benzylique, subissent un réarrangement de Curtius fournissant les carbamates de benzyle **16**. Enfin, les β -aminoacides **17** ont été obtenus après hydrogénation catalytique de **16**.

⁶¹ Berkessel, A. ; Glaubitz, K. ; Lex, J. *Eur. J. Org. Chem.* **2002**, 2948-2952

⁶² Bolm, C. ; Schiffrers, I. ; Atodiresel, J. ; Hackenberger, C. P. R. *Tetrahedron: Asymmetry* **2003**, 22, 3455-3467



b) Additions de Michael

i) Version racémique

L'addition de Michael d'ammoniac ou d'amines primaires sur les acrylates cycliques **18** et **19** permet d'obtenir les acides *trans*-ACPC (\pm)-**20** et *trans*-ACPC (\pm)-**21** *N*-substitués correspondants, avec des rendements allant de 54 à 90 % (schéma 4)⁵⁹. Le contrôle thermodynamique de la réaction permet d'accéder majoritairement au composé de configuration *trans*.

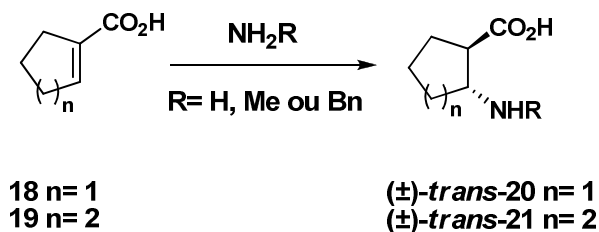


Schéma 4

ii) Version stéréosélective

Davies *et coll.* ont développé une version stéréosélective de cette réaction sur les esters *tert*-butyliques **22** et **23**⁶³ (Schéma 5). Ainsi, l'addition de l'amidure chiral sur **22** et **23** permet d'obtenir respectivement les composés **cis-24** et **cis-25** avec des excès diastéréoisomériques supérieurs à 95 %. Le composé **25** est débenzylé par hydrogénolyse, puis, hydrolysé pour conduire à l'acide **(1*S*,2*R*)-cis-2** avec un rendement de 71 %.

L'épimérisation en C1 des esters **cis-24** et **cis-25** a également été réalisée par action de KHMDS et de *tert*-butanol pour mener respectivement aux dérivés **trans-24** et **trans-25** avec de bons excès diastéréoisomériques. Selon les mêmes protocoles de débenzylation et d'hydrolyse utilisés auparavant, les acides **(1*R*,2*R*)-trans-1** et **(1*R*,2*R*)-trans-2** correspondant ont été obtenus respectivement avec des rendements de 62 et 56 %. De la même manière, l'application de cette méthode à **22** et **23** avec l'autre énantiomère de l'amidure, permet d'accéder aux énantiomères **(1*S*,2*S*)-1** et **(1*S*,2*S*)-2** avec de bons excès énantiomériques.

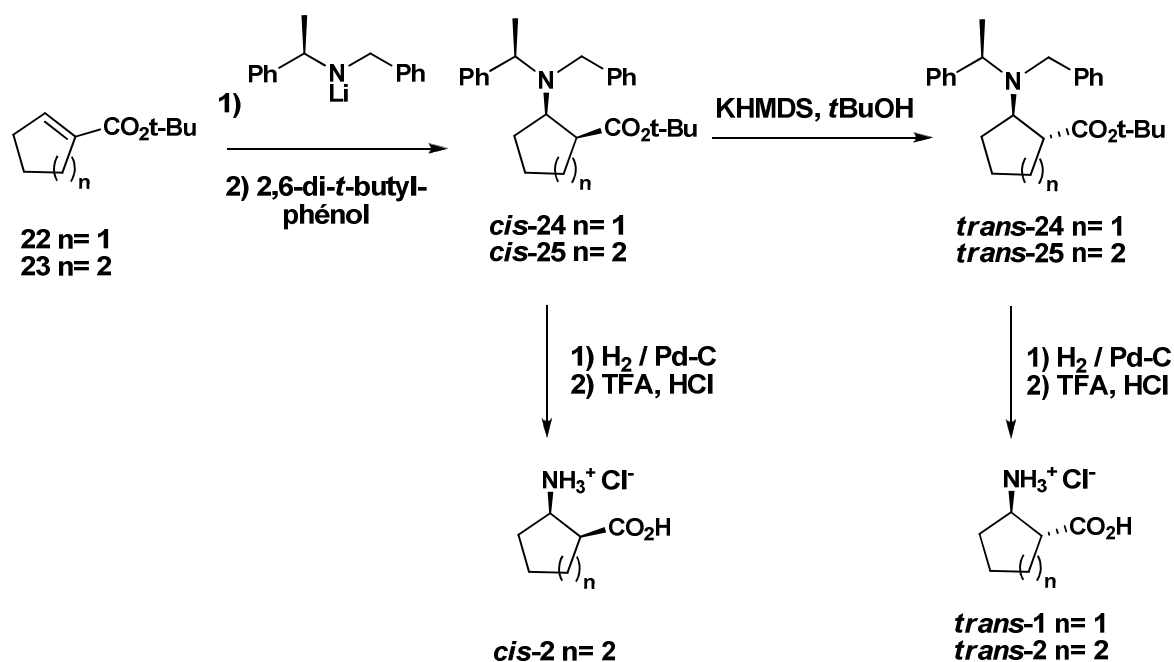


Schéma 5

⁶³ Davies, S. G. ; Ichihara, O. ; Lenoir, I. ; Walters, I. A. S. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **1994**, 1411-1415

c) A partir des β -lactames

Bien que les β -aminoacides soient des précurseurs de β -lactames, la transformation inverse constitue une stratégie de synthèse intéressante (Schéma 6).

Les β -lactames bicycliques **28** sont obtenus par cycloaddition [2+2] thermique de l'isocyanate de chlorosulfonyle (CSI) **27** sur différents cycloalcènes **26**^{14b}. Cette cycloaddition s'effectue de manière régio- et stéréosélective. La coupure du motif chlorosulfonyle des lactames **28** est menée en milieu basique aqueux pour conduire aux β -lactames **29**. L'ouverture de ces derniers par l'action d'acide chlorhydrique fournit les chlorhydrates de β -aminoacides cycliques **30** de stéréochimie relative *cis*.

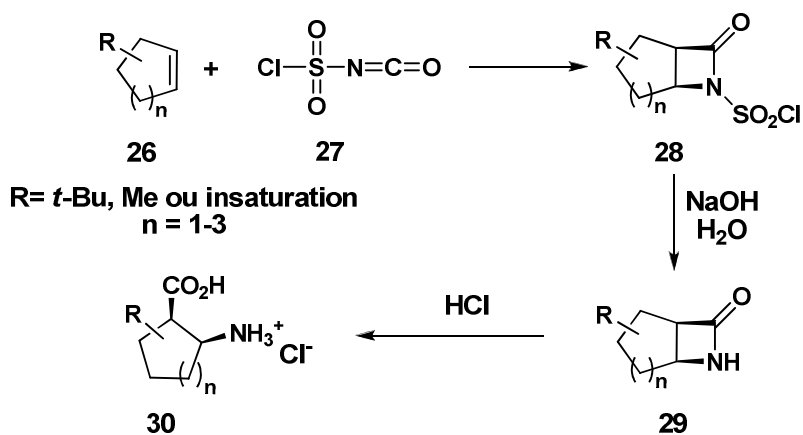


Schéma 6

Fülöp *et coll.* ont mis au point des synthèses régio- et diastéréosélectives d'ACHC hydroxylés en différentes positions⁶⁴.

i) Fonction hydroxyle en position 3

L'étape clé est une cycloaddition entre un partenaire 1,3-cyclohexadiène et le CSI pour fournir le β -lactame **31** conservant une insaturation (Schéma 7). Grâce à la réactivité de cette insaturation, le motif cyclohexane a été hydroxylé de façon régio- et stéréosélective sur plusieurs positions.

⁶⁴ a) Szakonyi, Z. ; Györfalvi, S. ; Forró, E. ; Hetényi, A. ; De Kimpe, N. ; Fülöp, F. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 19, 4017-4023, b) Fülöp, F. ; Palko, M. ; Forró, E. ; Dervarics, M. ; Martinek, T. M. ; Sillanpää, R. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 15, 3214-3220

L'acide **(±)-32** obtenu par ouverture du β-lactame **(±)-31**, a été traité avec un mélange de di-iodure, de NaHCO₃ et de NaI, pour former l'iodolactone **(±)-33**. Celle-ci a été deshalogénée en présence d'AIBN avec l'hydruure de tributylétain pour fournir le composé **(±)-34**. Enfin, l'hydrolyse acide a conduit à l'acide aminé **(±)-35** avec un rendement global de 52 %.

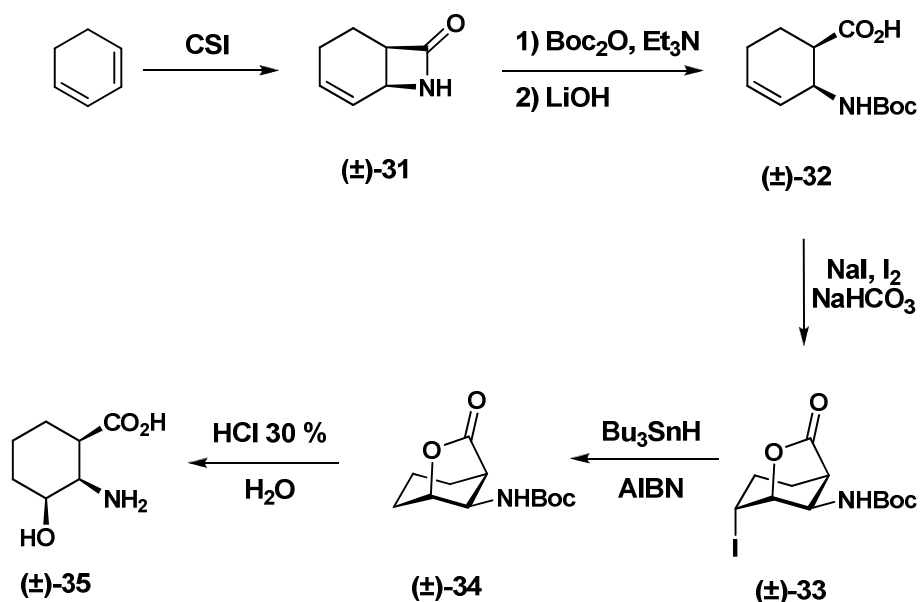


Schéma 7

Les auteurs ont adapté cette synthèse en série énantiopure. Ainsi, les composés **(+)-36** et **(-)-37** ont été obtenus par la résolution enzymatique du β-lactame **(±)-31** à l'aide de la lipolase de *Candida antarctica*. Puis, la méthode développée en version racémique a été appliquée sur chaque composé pour isoler les énantiomères **(1R,2R,3S)-38** et **(1S,2S,3R)-39** avec des rendements globaux atteignant 67 % et des excès énantiomériques supérieurs à 98 % (Schéma 8).

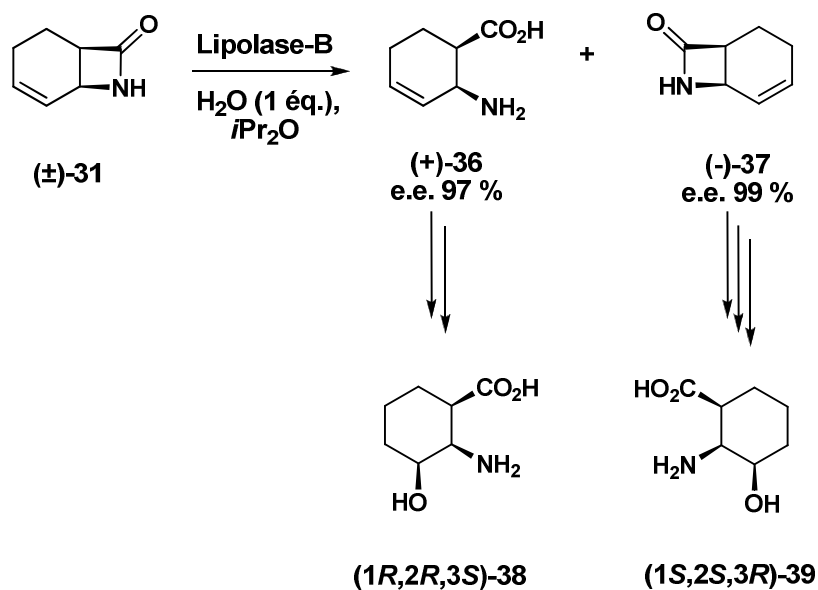


Schéma 8

ii) Fonction hydroxyle en position 4

La diastéréosélectivité est établie dès la première étape, lorsque le composé **40** est traité par le *N*-iodosuccinimide (NIS) pour former le composé bicyclique **41**^{63b} (Schéma 9). Celui-ci a été traité par l'hydruure de tributylétain en présence d'AIBN pour conduire au composé **42**. Le traitement en milieu acide à reflux de **42** a fourni le composé **(1R,2S,4R)-43** avec un excès énantiomérique supérieur à 98 %. Le diastéréoisomère **(1S,2S,4R)-46** a été obtenu à partir de l'ester **44** par le même protocole et avec un excès énantiomérique comparable.

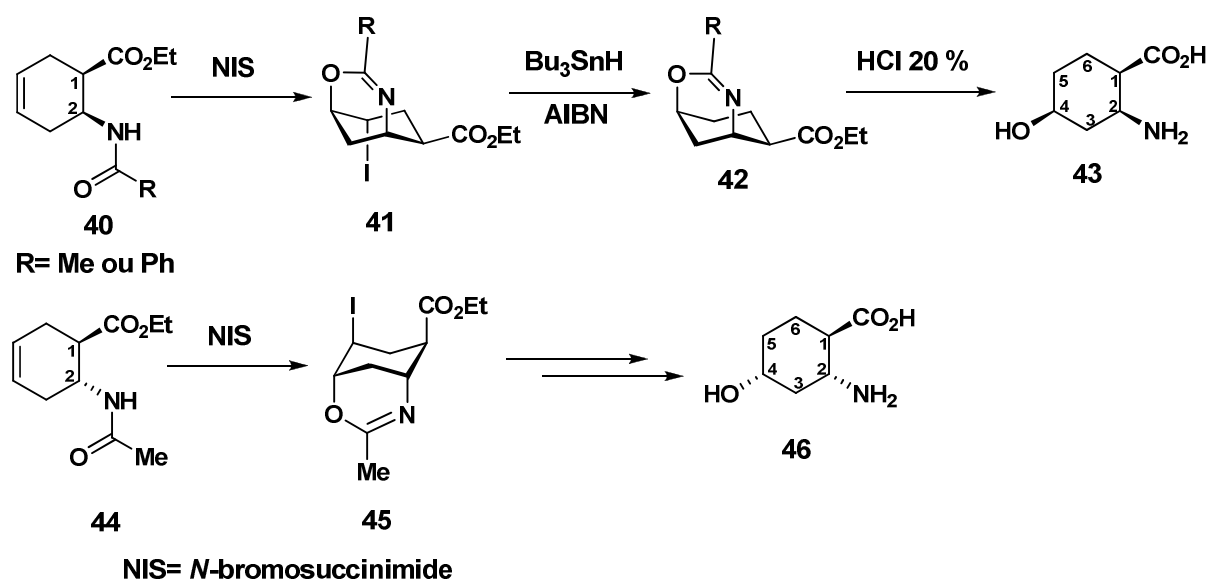


Schéma 9

d) Formation de cycles

Les précurseurs cyclopentanes et cyclohexanes sont facilement disponibles. Cependant, il est tout à fait possible d'accéder aux β -aminoacides par la création du carbocycle.

Konosu et Oida ont décrit un protocole simple pour la préparation de l'acide **cis-(1*R*,2*S*)-1** à partir de l'aldéhyde **47** énantiomériquement pur⁶⁵ (schéma 10). Ainsi, le composé **47** a été transformé en nitrone par action de la *N*-benzylhydroxylamine. Cette nitrone subit directement une cycloaddition [3+2] dipolaire intramoléculaire pour conduire à l'isoxazolidine **48** avec une haute diastéréosélectivité (**48/49** = 15:1). L'ouverture de l'hétérocycle **48** par hydrogénolyse catalytique, suivie de la protection de l'amine primaire par un groupement Boc conduit au composé **50** avec un rendement global de 93 %. Ce dernier a été à son tour transformé en acide (**1*R*,2*S*)-1** par coupure oxydante du diol-1,2, puis, déprotection de l'amine.

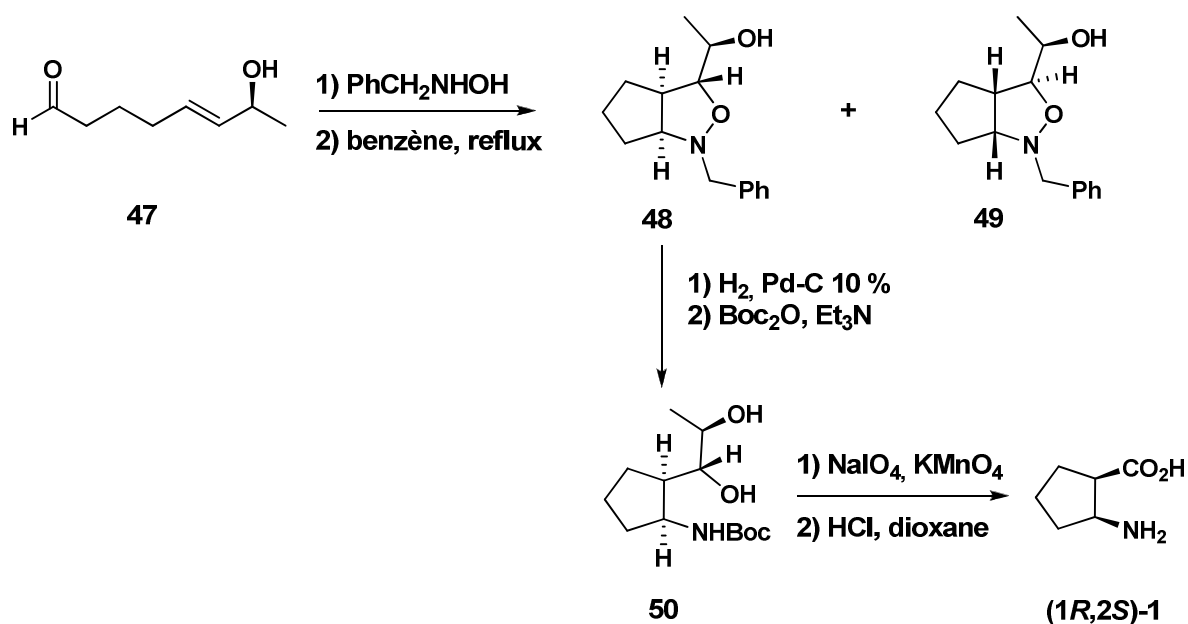


Schéma 10

La réaction de RCM (Ring Closure Metathesis) est une méthode qui permet de former un cycle entre deux partenaires oléfiniques portés sur la même structure⁶⁶. L'équipe de Davies a mis au point la synthèse du **trans-(1*R*,2*R*)-1** énantiopur en utilisant la réaction de RCM⁶⁷ (Schéma 11). Selon leur méthodologie habituelle, les auteurs ont réalisé une addition de Michael sur le composé **51** avec l'amine **52** pour former le β -aminoester **53**. Celui-ci est

⁶⁵ Konosu, T. ; Oida, S. *Chem. Pharm. Bull.* **1993**, *41*, 1012-1018

⁶⁶ a) Grubbs, R. H. ; Tumas, W. *Science* **1989**, *243*, 907-915, b) Grubbs, R. H. ; Miller, S. J. ; Fu, G. C. *Acc. Chem. Res.* **1995**, *28*, 446-452, c) Grubbs, R. H. ; Chang, S. *Tetrahedron*, **1998**, *54*, 4113-4140, d) Grubbs, R. H. *Tetrahedron*, **2004**, *60*, 7117-7140

⁶⁷ Chippindale, A. M. ; Davies, S. G. ; Iwamoto, K. ; Parkin, R. M. ; Smethurst, C. A. P. ; Smith, A. D. ; Rodriguez-Solla, H. *Tetrahedron* **2003**, *59*, 3253-3265

ensuite alkylé sur le carbone en α de l'ester et *N*-déalkylé pour conduire à un mélange de diastéréoisomères séparables (***syn/anti***)-**54**. Le composé ***anti***-**54** est alors récupéré pour être traité avec le carbonate de benzyle et fournir le carbamate **55** à hauteur de 40 % et un e.d. supérieur à 95 %. Le composé **55** est ensuite engagé dans l'étape de métathèse cyclisante avec le catalyseur de Grubbs I. Les auteurs ont obtenu le composé cyclique **56** avec un rendement de 85 % et la conservation du e.d. Enfin, une simple déprotection de l'amine par hydrogénation catalytique conduit au ***trans*-(1*R*,2*R*)-1** optiquement pur.

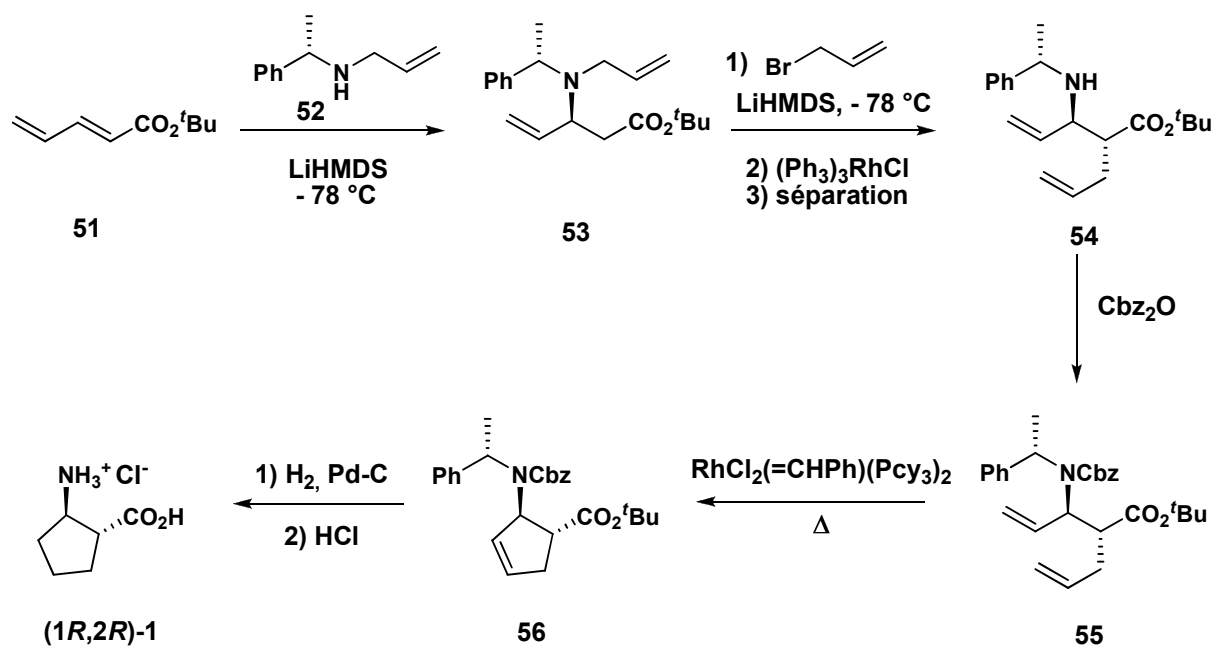


Schéma 11

e) A partir de composés aromatiques

La réduction de l'acide anthranilique **57** par le sodium dans l'alcool amylique est une réaction qui permet d'isoler le ***trans***-ACHC (**\pm**)-**2**⁶⁸. Cependant, cette méthode donne une faible sélectivité en isomères *cis/trans* ou le rendement de (**\pm**)-**2** ne dépasse pas 40 % (schéma 12).

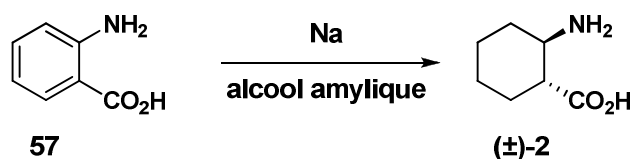


Schéma 12

⁶⁸ Horvath-Dora, K.; Toth, G.; Tamas, J.; Clauder, O. *Acta Chim. Sci. Hung.* **1977**, *94*, 345-349

Priego *et al.* ont décrit la synthèse des 4 stéréoisomères de l'ACHC à partir de l'anhydride isatoïque **58**⁶⁹ (Schéma 13). Celui-ci réagit avec la (*S*)- α -méthylbenzylamine **(+)-10** pour donner l'amide chiral énantio pur **59**, qui est ensuite traité avec l'orthoester de méthyle et de l'acide *para*-toluènesulfonique formant le bicyclic aromatique **60**. Celui-ci est réduit par hydrogénation catalytique et conduit à un mélange des diastéréoisomères séparables *cis*-**61** et *cis*-**62** majoritaires et du *trans*-**63** minoritaire. Par action de l'acide chlorhydrique à reflux sur *cis*-**61** et *cis*-**62**, les composés *cis*-(**1S,2R**)-**2** et *cis*-(**1R,2S**)-**2** ont été obtenus avec un rendement global respectif de 41 et 20 %. Les deux énantiomères *trans*-(**1R,2R**)-**2** et *trans*-(**1S,2S**)-**2** sont obtenus, quant à eux, avec 33 et 16 % de rendement global après épimérisation des isomères *cis*.

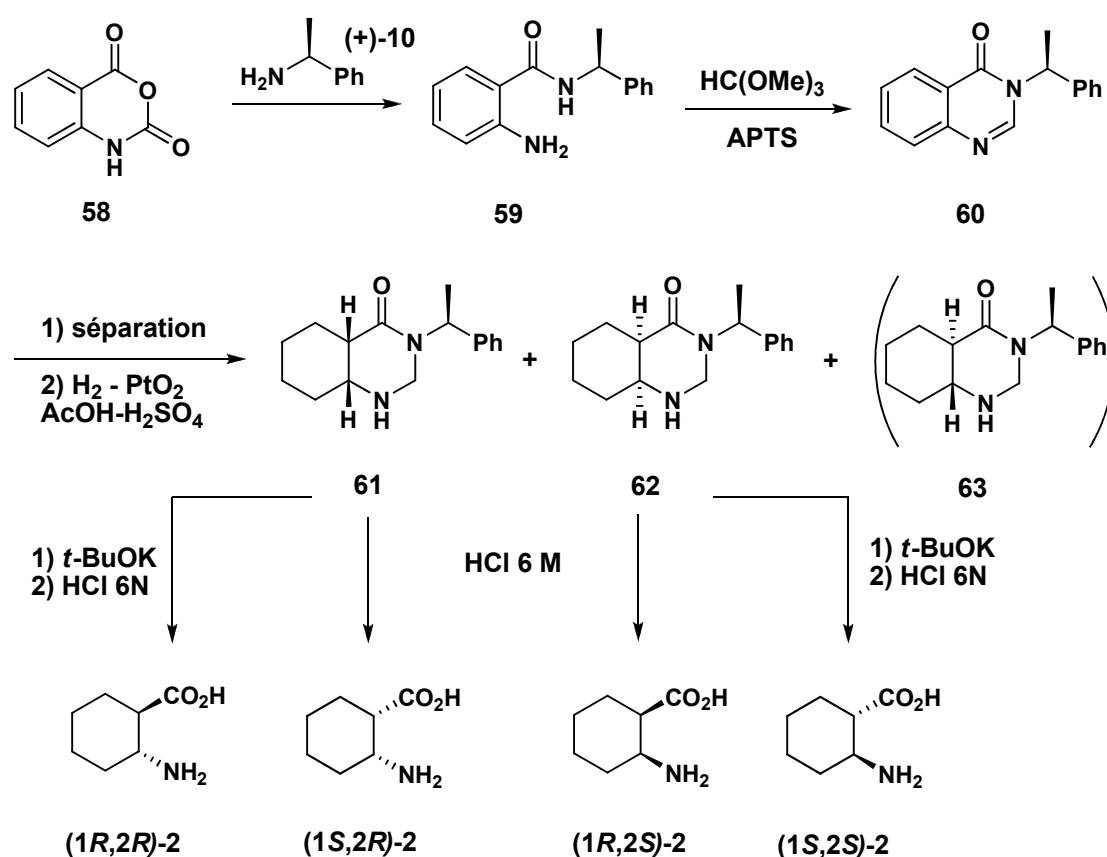


Schéma 13

f) Ouverture d'époxyde

Fringuelli *et al.* ont développé une méthode de synthèse d' α -hydroxy- $\beta^{2,3}$ -aminoacides énantiomériquement enrichis dont l'acide **(1S,2S)-67**⁷⁰. Celui-ci a été obtenu à partir de

⁶⁹ Priego, J. Flores, P. ; Ortiz-Nava, C. ; Escalante, J. *Tetrahedron Asymmetry* **2004**, 15, 3545-3549

⁷⁰ Fringuelli, F. ; Pizzo, F. ; Rucci, M. ; Vacarro, L. *J. Org. Chem.* **2003**, 68, 7041-7045

l'époxyde **65** avec un rendement de 80 % et un excès énantiomérique supérieur à 90 %. La méthode est basée sur un mécanisme catalytique impliquant le cuivre et la réaction a été réalisée dans l'eau (Schéma 14).

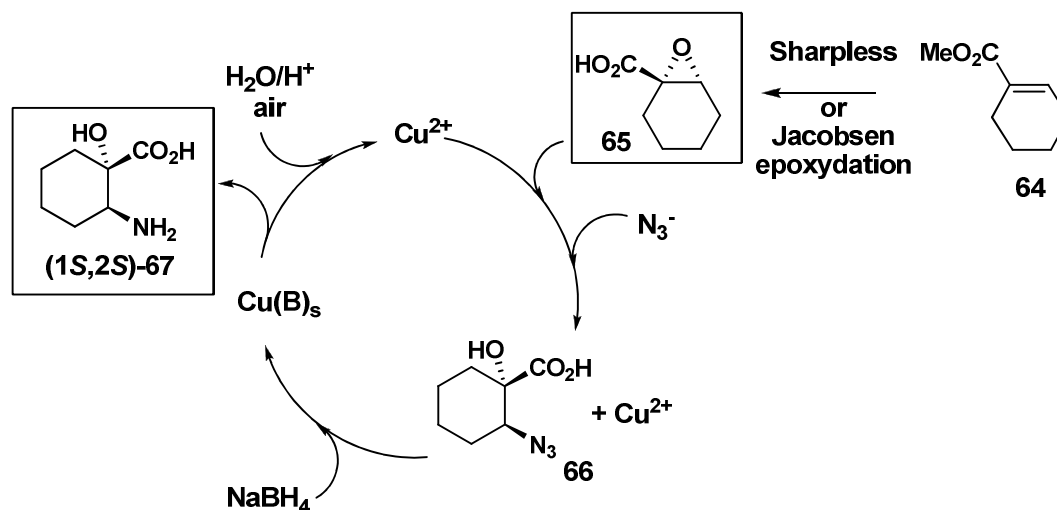
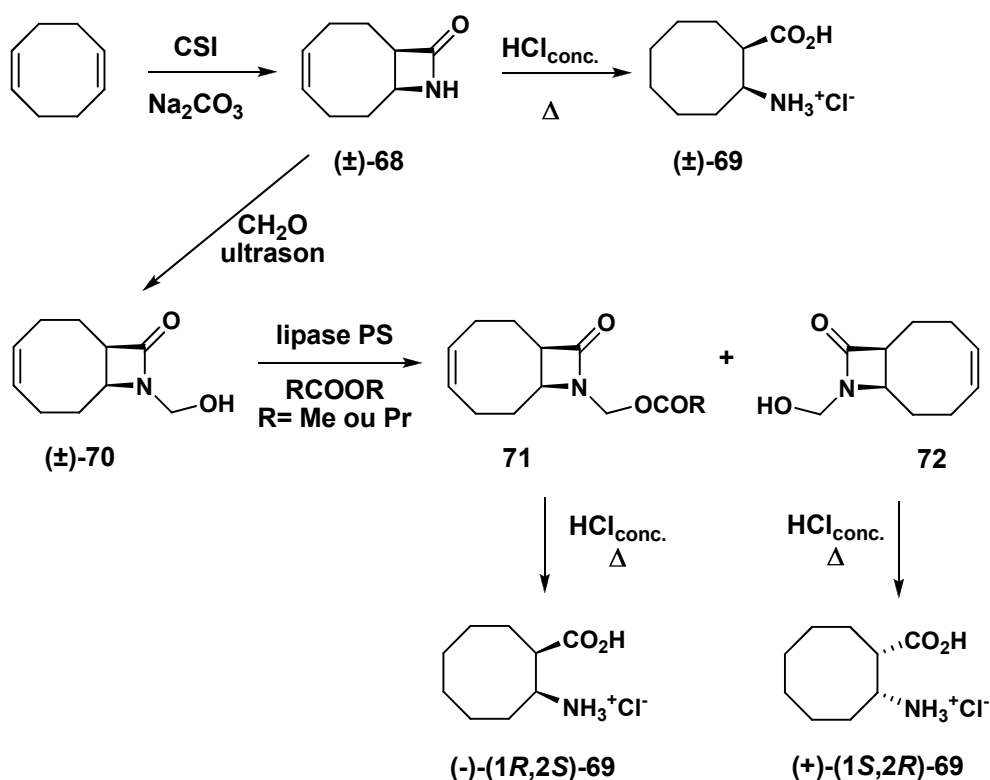


Schéma 14

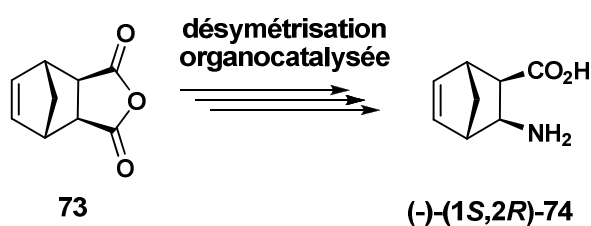
2) β -aminoacides bicycliques et à cycles moyens

La création de β -aminoacides à cycles moyens est limitée par la faible disponibilité de leurs précurseurs. Fülöp *et coll.* ont largement étudié l'accès aux β -aminoacides alicycliques cyclohexaniques et cyclopentaniques par résolution enzymatique de dérivés β -lactamiques. Ces chercheurs ont également réalisé la synthèse du β -aminoacide cyclooctanique **69** (*cis*-ACOC) de configuration relative *cis*⁷¹ (Schéma 15). Ainsi, le *cis*-ACOC (\pm)-**69** a été préparé en deux étapes à partir du 1,5-cyclooctadiène avec un rendement global de 10 % (*cf.* section 1.c p. 45). Une adaptation en série énantio pure a été réalisée à partir de (\pm)-**70**, lequel a été obtenu par l'alkylation de l'azétidinone (\pm)-**68**. L'hydroxylamide (\pm)-**70** a été traité avec la lipase de *Pseudomonas cepacia* pour conduire à l'estérification sélective d'un énantiomère. Chacun des composés **71** et **72** a été chauffé à reflux d'une solution éthanolique d'acide chlorhydrique pour fournir les chlorhydrates des aminoacides *cis*-(**1S,2R**)-**69** et *cis*-(**1R,2S**)-**69**, avec des excès énantiomériques de 81 % et 98 % respectivement.

⁷¹ Forró, E. ; Árvai, J. ; Fülöp, F. *Tetrahedron: Asymmetry* **2001**, 12, 643-649

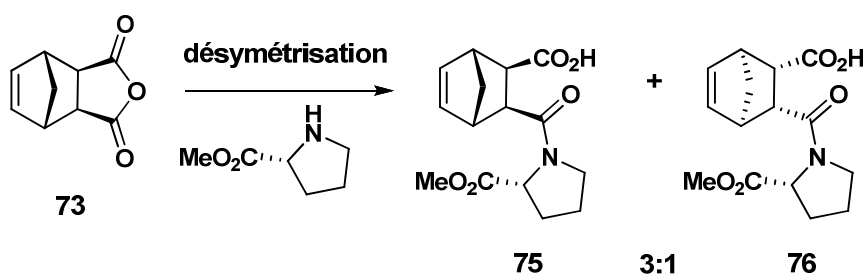


Les β -aminoacides bicycliques sont aussi peu nombreux que les β -aminoacides à cycle moyen. Bolm *et al.*⁶² ont décrit dans leur méthode générale (*cf.* section 1.a p.42), l'accès aux énantiomères du β -aminoacide norbornène⁶². Ainsi, à partir de l'anhydride méso **73** et en 3 étapes, l'énantiomère **(-)-(1S,2R)-74** a été obtenu avec un rendement global de 66 % et un excès énantiomérique de 93 % (Schéma 16).

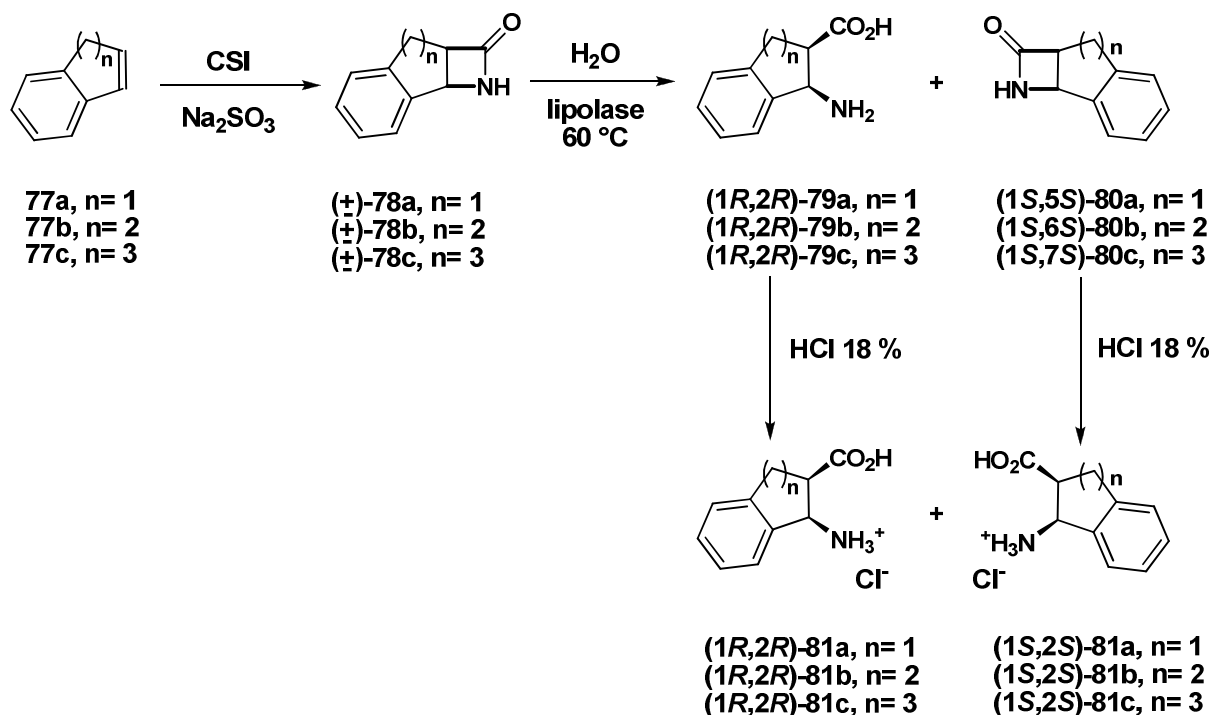


North *et coll.* ont également étudié la synthèse du β -aminoacide norbornène **74** par la désymétrisation de l'anhydride **73**, réalisée par couplage avec la (*R*)-méthylester proline⁷² (Schéma 17). La désymétrisation a conduit au mélange de diastéréoisomères **75** et **76** avec un rapport de 3:1 et un rendement de 89 %. Les deux diastéréoisomères ont pu être séparés par chromatographie.

⁷² Jones, I. G. ; Jones, W. ; North, M. ; Teijeira, M. ; Iriarte, E. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 889-892



Fülöp *et coll.* ont synthétisé les énantiomères de β -aminoacides bicycliques à partir de leur dérivés aromatiques⁷³. Ces auteurs ont utilisé la résolution de dérivés β -lactamiques (Schéma 18). La réaction du CSI avec le composé **77** a fourni le lactame (\pm)-**78**. Celui-ci a été engagé dans la résolution enzymatique avec la lipolase de *Candida antarctica*, pour isoler l'aminoacide **79** et le β -lactame **80** énantiomériquement enrichis (e.e. > 96 %). Ces derniers ont été mis en réaction dans une solution d'acide chlorhydrique à reflux pour conduire aux chlorhydrates des énantiomères **81** optiquement purs.



⁷³ Forro, E. ; Fülöp, F. *Chem. Eur. J.* **2006**, 12, 2587-2592

3) β -aminoacides à 4 et 3 chaînons

a) La réactivité intrinsèque d'un petit cycle

Par rapport à ce qui est décrit pour les cycles à 6 et 5 chaînons, la littérature fait état de peu de synthèses sur les β -aminoacides à petit cycle. La première raison à cela est la faible disponibilité de précurseurs cyclobutaniques et cyclopropaniques. La seconde raison est spécifique à la nature instable et plus particulièrement à l'ouverture de cycle.

Ce phénomène d'ouverture est observé lorsque le cycle 4 ou 3 chaînons possède une fonction amine libre en β d'une fonction carbonyle. Les résultats de travaux de recherches ont montré qu'il est impossible d'isoler les dérivés de l'acide *cis*-2-aminocyclopropanecarboxylique (*cis*-ACPrC) non-protégés sur l'azote⁷⁴. Celui-ci s'ouvre pour fournir l'ammonium linéaire (Schéma 19a). Le même processus existe sur les dérivés du *cis*-ACBC non protégés sur l'azote⁷⁵ (Schéma 19b). Il est donc évident qu'il vaut mieux travailler avec des dérivés *N*-protégés pour inhiber cet effet push-pull (rétro-Mannich).

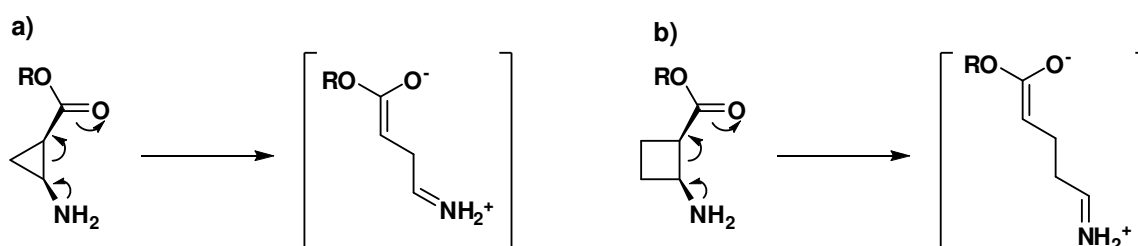


Schéma 19

En témoignage des difficultés à synthétiser des dérivés du *cis*-ACPrC avec la fonction amine libre, Kraus *et al.* avaient annoncé en 1990, la synthèse du dérivé **83** *N*-déprotégé à partir de **82** par action de KHMDS et d'ammoniac⁷⁶. Mais Taylor *et al.* ont démontré quelques années plus tard, que le produit obtenu était en fait le composé **84**⁷⁷ (Schéma 20).

⁷⁴ Cannon, J. G. ; Garst, J. E.; *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 182-184

⁷⁵ Aitken, D. J. ; Gauzy, C. ; Pereira, E. ; *Tetrahedron Lett.* **2004**, *45*, 2359-2361

⁷⁶ Kraus, G. A.; Kim, H.; Thomas, P. J.; Metzler, D. E.; Taylor, J. E. *Synth. Commun.* **1990**, *20*, 2667-2669

⁷⁷ Taylor, E. C.; Hu, B. *Synth. Commun.* **1996**, *26*, 1041-1044

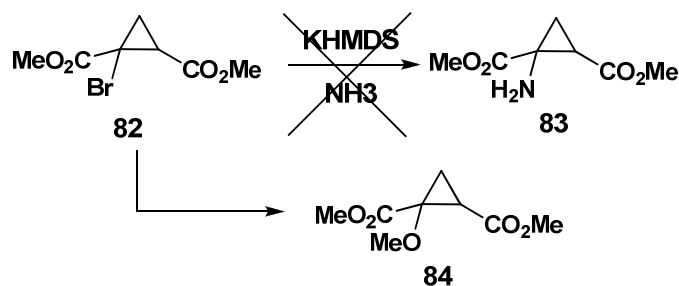


Schéma 20

b) Synthèse de dérivés cyclopropaniques

i) Réarrangements de dérivés d'acides 1,2-dicarboxyliques

Comme nous l'avons cité précédemment pour les cycles à 6 et 5 chaînons et les composés bicycliques, Bolm *et al.* ont développé une méthode de désymétrisation organocatalysée d'anhydrides bicycliques méso (*cf.* section 1.a p.42). Cette méthode a été appliquée à un dérivé du *cis*-ACPrC⁶¹. Ainsi, à partir de l'anhydride **85** et en 2 étapes, l'énantiomère **(1S,2R)-87** a été obtenu avec un rendement de 63 % et un excès énantiomérique de 92 %. (Schéma 21).

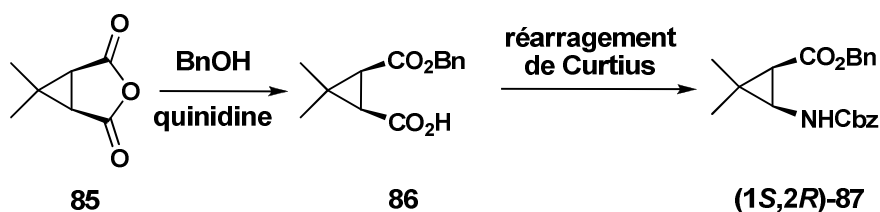
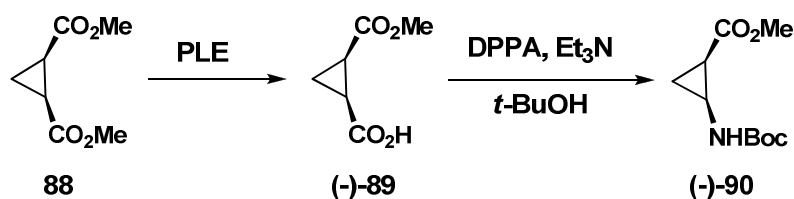


Schéma 21

Csuk et von Scholz ont préparé le composé **(-)-90** à partir du diester méso **88**⁷⁸. Une hydrolyse sélective catalysée par l'estérase de foie de porc (PLE) a conduit au monoester **(1R,2S)-89** avec un excès énantiomérique supérieur à 99 %. Puis, le traitement de **(-)-89** avec l'azoture de diphenylphosphinate en présence de *tert*-butanol a fourni le composé **(-)-90** par réarrangement de Curtius et avec un rendement de 47 % (Schéma 22)

⁷⁸ Csuk, R. ; von Scholz, Y. *Tetrahedron* **1994**, 50, 10431-10442



DPPA : azoture de diphenylphosphinate

Schéma 22

ii) Synthèse via la méthano-homosérine

L'acide méthanoaspartique est un composé cyclopropanique particulier étant à la fois un α -aminoacide et β -aminoacide. Quelques dérivés ont été préparés à partir d'un autre α -aminoacide cyclopropanique, la méthano-homosérine (\pm)-**91**. Wick *et al.* ont décrit le réarrangement d'Hofmann du dérivé (\pm)-**91**. Après la protection de l'hydroxyle de (\pm)-**91** sous forme d'éther silylé, le réarrangement d'Hofmann avec le tétraacétate de plomb suivi de la déprotection de l'alcool primaire ont fourni le composé (\pm)-**92**. L'oxydation de celui-ci, a donné le composé (\pm)-**93** avec un rendement global de 26 %⁷⁹ (schéma 23).

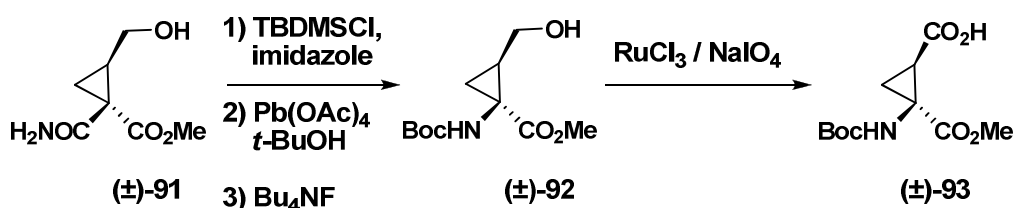


Schéma 23

iii) Cyclopropanation d'oléfines protégées

La cyclopropanation⁸⁰ du pyrrole *N*-protégé (\pm)-**94** avec du diazoacétate de méthyle, en présence d'un mélange catalytique de cuivre(II) et de phénylhydrazine, a été réalisée avec un rendement de 45 % pour conduire à l'adduit bicyclique (\pm)-**95** (Schéma 24). L'ouverture de cet adduit par ozonolyse puis hydrolyse en milieu réducteur a conduit à l'intermédiaire (\pm)-**96**. La fonction aldéhyde a été oxydée, puis l'action d'hydrogénocarbonate de potassium a permis d'obtenir le dérivé (\pm)-**97** en 2 étapes avec un rendement global de 32 %. De manière alternative, la saponification de (\pm)-**95** permet d'accéder à l'acide (\pm)-**98**. L'ozonolyse de (\pm)-

⁷⁹ Wick, L. ; Tamm, C. ; Boller, T. *Helv. Chem. Acta* **1995**, 78, 403-407

⁸⁰ a) Bubert, C.; Cabrele, C.; Reiser, O. *Synlett*. **1997**, 827-8012, b) Beumer, R.; Bubert, C.; Cabrele, C.; Reiser, O. *J. Org. Chem.* **2000**, 65, 8960-8969

98 et l'action d'anhydride acétique en présence de triéthylamine fournit **(±)-99** qui est déformylé à son tour pour offrir **(±)-100** avec un rendement global de 26 %.

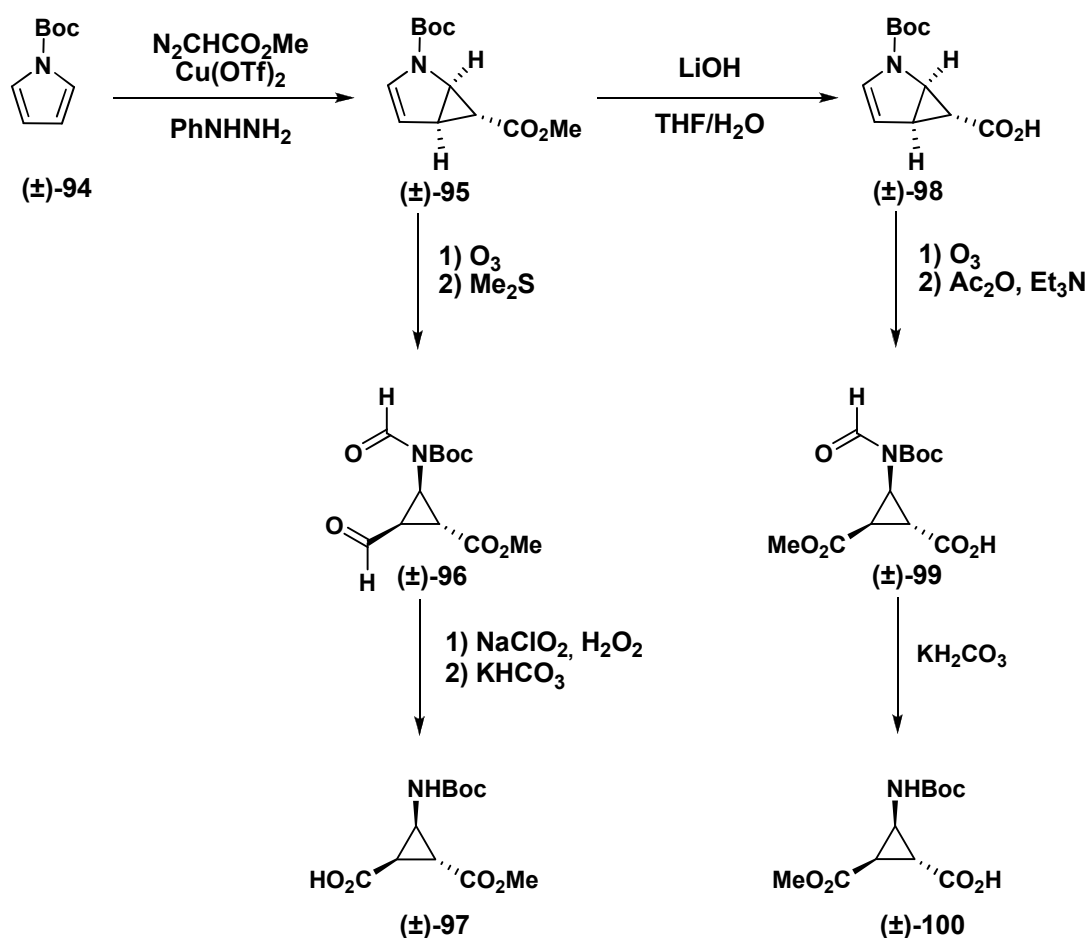


Schéma 24

c) Synthèse de dérivés cyclobutaniques

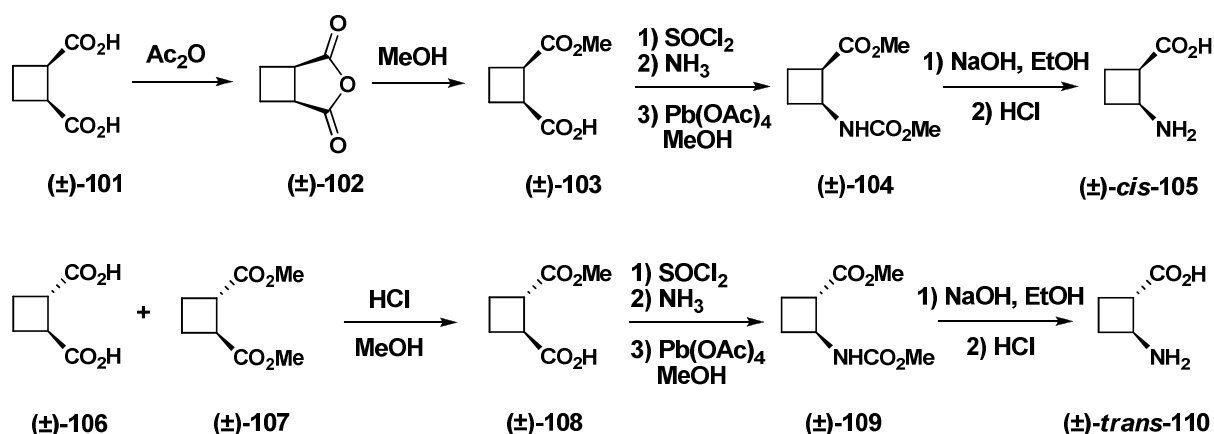
Il existe trois approches de synthèse de β -aminoacides cyclobutaniques et de leurs dérivés. Il sera détaillé l'approche par les dérivés 1,2-dicarboxylates largement exploitée dans la préparation d'autres β -aminoacides, et nous verrons deux approches sur la construction de dérivés cyclobutaniques, par voie thermique et par voie photochimique.

i) Réarrangements de dérivés 1,2-dicarboxyliques

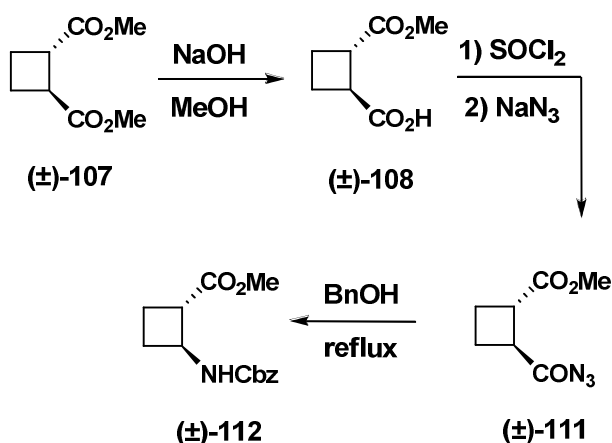
Cette stratégie consiste à désymétriser l'acide *cis*- ou *trans*-1,2-cyclobutanedicarboxylique afin de pouvoir transformer l'une des fonctions acide en fonction amine. Les méthodes sont similaires à celles décrites pour les β -aminoacides à 6, 5 et 3 chaînons et les β -aminoacides bicycliques que nous avons évoqué dans les sections précédentes.

1) version racémique

En 1972, Cannon *et al.* ont décrit la formation des acide-esters **(±)-103** et **(±)-108** obtenus à partir des diacides isomères **(±)-101** et **(±)-106**. La transformation de **(±)-103** et **(±)-108** en carbamates **(±)-104** et **(±)-109** a été obtenue *via* le réarrangement d'Hofmann⁸¹. Cette méthode a été reprise par Kennewell *et al.* pour accéder aux β-aminoacides cyclobutaniques **(±)-105** et **(±)-110**⁸² (Schéma 25).



Une dégradation de type Curtius a été utilisée par Shroff *et al.* pour effectuer la synthèse de l'aminoacide protégé **(±)-112**⁸³ (Schéma 26). L'hémi-ester méthylique **(±)-108** a été transformé en chlorure d'acide, puis, en azoture d'acyle **(±)-111**. Le réarrangement de Curtius réalisé dans l'alcool benzylique à reflux a permis d'obtenir l'aminoacide racémique **(±)-112** avec un rendement global de 33 %.



⁸¹ Cannon J. G. ; Rege, A. B. ; Long, J. P. *J. Med. Chem.* **1972**, *15*, 71-75

⁸² Kennewell, P. D. ; Matharu, S. S. ; Sammes, P. G. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, **1982**, 2563-2666

⁸³ Shroff, C. C. ; Stewart, W. S. ; Uhm, S. J. ; Wheeler, J. W. *J. Org. Chem.* **1971**, *36*, 3356-3361

2) Version énantiosélective

En 1998, Ortuño *et coll.* ont décrit la première synthèse énantiosélective du *cis*-ACBC (–)-**105** en utilisant une approche chimioenzymatique⁸⁴ (Schéma 27a). Le *méso*-diester (±)-**113** a été obtenu par estérification au diazométhane du diacide (±)-**101** commercial. L'hydrolyse de cet ester catalysée par l'estérase de foie de porc (PLE) a mené à l'ester-acide (–)-**103** avec un excès énantiomérique supérieur à 97 % et un rendement de 91 %⁸⁵. Le composé (–)-**114** a été préparé à partir de (–)-**103**, par traitement avec le chloroformate d'éthyle en présence de triéthylamine et d'azoture de sodium. Il a ensuite subi un réarrangement de Curtius, en présence d'alcool benzylique, ce qui a conduit à la formation de (–)-**115**. La saponification puis l'hydrogénolyse catalytique de (–)-**115** a fourni le *cis*-β-aminoacide (–)-(**1R,2S**)-**105** avec un rendement global de 41 % et un excès énantiomérique supérieur à 97 %.

L'autre énantiomère a été obtenu à partir de l'hémi-ester (–)-**103** (Schéma 27b). La fonction acide de l'hémi-ester a été protégée orthogonalement en présence de 2,2,2-trichloroacétimide de *tert*-butyle **117** pour conduire au diester (+)-**118**⁸⁶. Ensuite, celui-ci a été sélectivement hydrolysé pour générer l'acide carboxylique (+)-**119**. A partir de cet intermédiaire, l'aminoacide *cis*-β-aminoacide (+)-(**1S,2R**)-**105** a été obtenu selon le mode opératoire décrit pour le composé (–)-(**1R,2S**)-**105**.

⁸⁴ a) Martin-Vila, Minguillon, C. ; Ortuño, M. R. *Tetrahedron Asymmetry*, **1998**, 9, 4291-4294, b) Martin-Vila, M. ; Mura, E. ; Giralt, E. ; Ortuño, M. R. *Tetrahedron Asymmetry*, **2000**, 11, 3569-3584

⁸⁵ Sabbioni, G. ; Jones, B. *J. Org. Chem.* **1987**, 53, 4565-4570

⁸⁶ Izquierdo, S. ; Rúa, F. ; Sbai, A. ; Parella, T. ; Alvarez-Larena, A. ; Branchadell, V. ; Ortuño, M. R. *J. Org. Chem.* **2005**, 70, 7963-7971

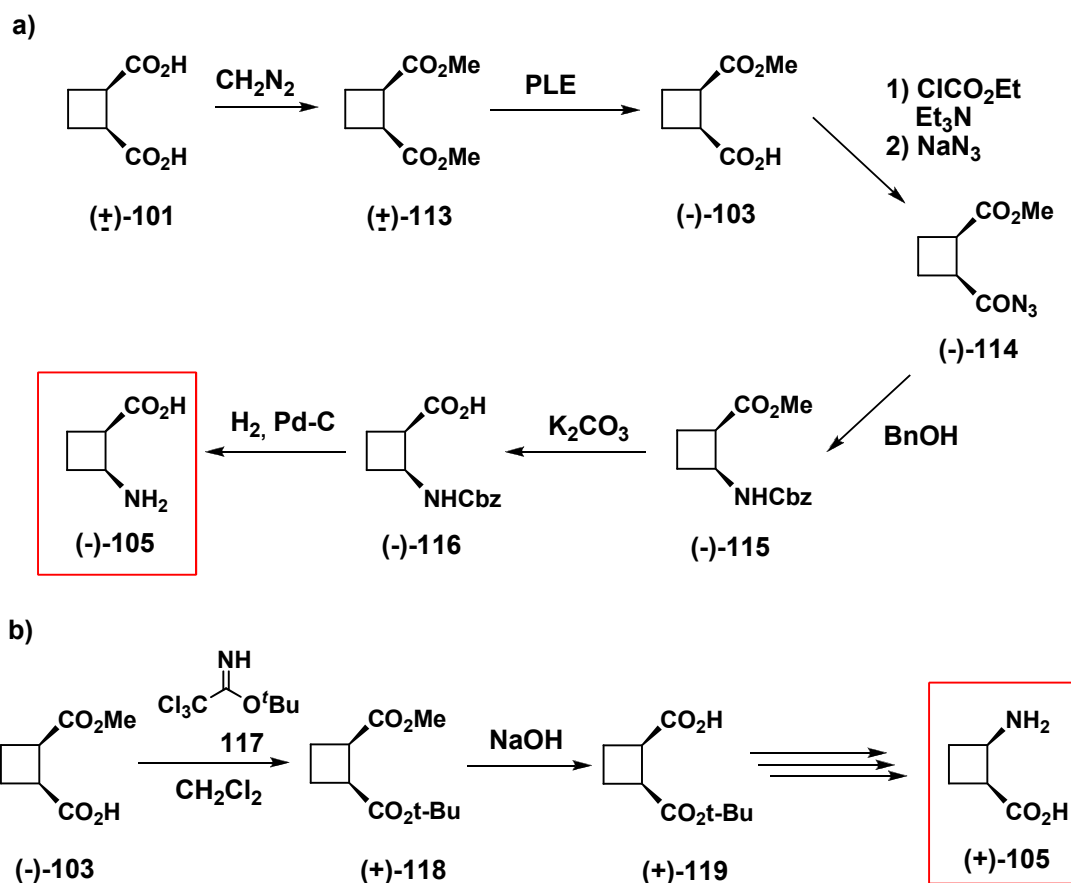


Schéma 27

Bolm *et al.* ont désymétrisé l'anhydride cyclobutanique *méso* **102** pour accéder à l'hémi-ester **(+)-120** optiquement pur avec un rendement supérieur à 85 %⁶¹ (Schéma 28). A partir de l'hémi-ester **(+)-120** et en 2 étapes, le composé **(+)-(1*R*,2*S*)-105** a été isolé avec un rendement global de 68 % et un excès énantiomérique de 93 %.

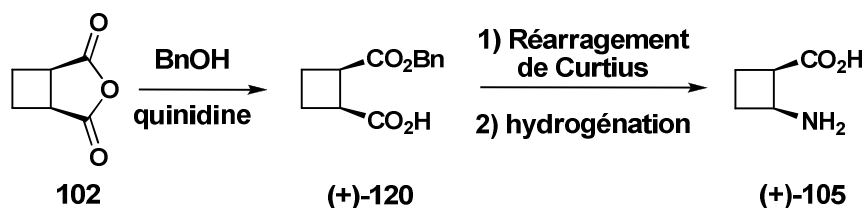


Schéma 28

ii) Construction de cycle par voie thermique

Brannock *et al.*⁸⁷ ont décrit la synthèse de dérivés du *cis*-ACBC par thermocycloaddition [2+2] d'énamines avec des acrylates. Les auteurs ont mis en réaction l'énamine **121** (R^1 et R^2 = alkyle) avec les acrylates **122** et **123** pour conduire aux composés **124** et **125** thermocyclisés (Schéma 29). Il y a quelques inconvénients à cette méthode comme l'absence de contrôle de la diastéréosélectivité, les conditions drastiques de température et l'impossibilité de passer d'une amine tertiaire dialkylée à une amine primaire.

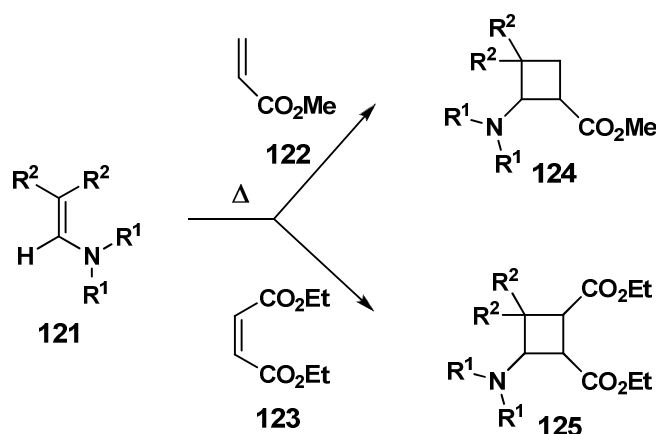


Schéma 29

iii) Construction de cycle par voie photochimique

1) Version racémique

Notre équipe a récemment mis au point une stratégie photochimique pour accéder à des β -aminoacides cyclobutaniques de configuration relative *cis* en 3 étapes⁸⁸ (Schéma 30). L'étape clé est la réaction de photocycloaddition [2+2] entre l'uracile **126** et l'éthylène pour conduire à l'adduit cyclobutanique (\pm)-**127**. L'acétone joue le rôle de solvant et de photosensibilisateur. Ensuite, le β -aminoacide (\pm)-**105** est obtenu par l'ouverture du composé (\pm)-**127** en présence de soude pour donner l'uréidoacide (\pm)-**128**, lequel subit une diazotation. Le rendement global à partir de l'uracile est de 52 %.

⁸⁷ Brannock, K. C. ; Bell, A. ; Burpitt, R. D. ; Kelly, C. A. *J. Org. Chem.* **1964**, 29, 801-812

⁸⁸ Aitken, D. J. ; Gauzy, C. ; Pereira, E. *Tetrahedron Lett.* **2002**, 43, 6177-6179

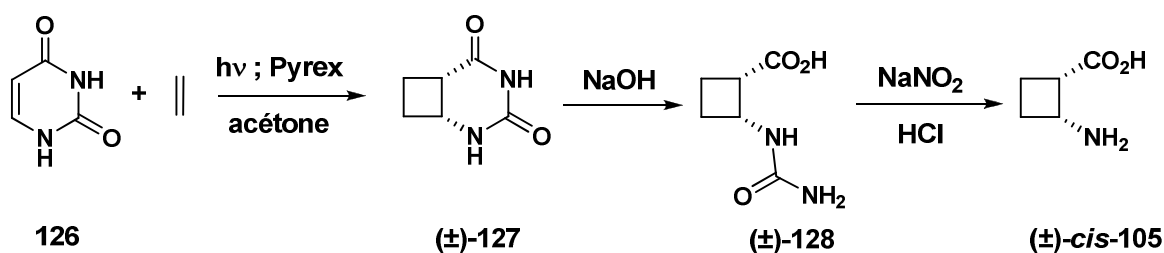
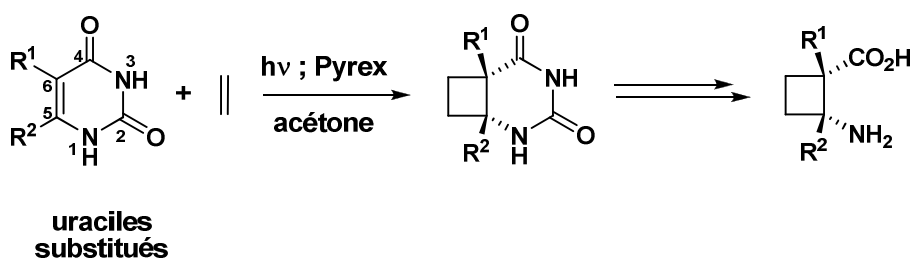


Schéma 31

Cette approche présente l'avantage d'être généralisable puisque à partir d'uraciles substitués en position 5 et 6, composés généralement commerciaux, une gamme de différents *cis*-β-aminoacides cyclobutaniques substitués en C-1 et C-2 a pu être préparé⁸⁹ (Tableau 3).



Entrée	R ¹	R ²
1	Me	H
2	Ph	H
3	CF ₃	H
4	F	H
5	NHZ	H
6	CH ₂ OH	H
7	CO ₂ H	H
8	H	Me
9	H	CF ₃

Tableau 3

2) Version énantiosélective

Avant le début de nos travaux, le laboratoire a initié un programme d'études destiné à développer une version stéréosélective de cette méthode. Après une étude de différents dérivés de l'uracile fonctionnalisés en *N*-1 et *N*-3 par un motif chiral, le composé **(+)-129** a été retenu comme un équivalent chiral de l'uracile pour être utilisé dans une réaction de photocycloaddition [2+2] avec l'éthylène. La réaction a fourni deux diastéréoisomères,

⁸⁹ Gauzy, C. ; Saby, B. ; Pereira, E. ; Faure, S. ; Aitken, D. J. *Synlett*, **2006**, 1394-1398

séparables par chromatographie sur gel de silice, avec des rendements respectifs de 49 et 31 % pour **(-)-130** et **(-)-131** (Schéma 31).

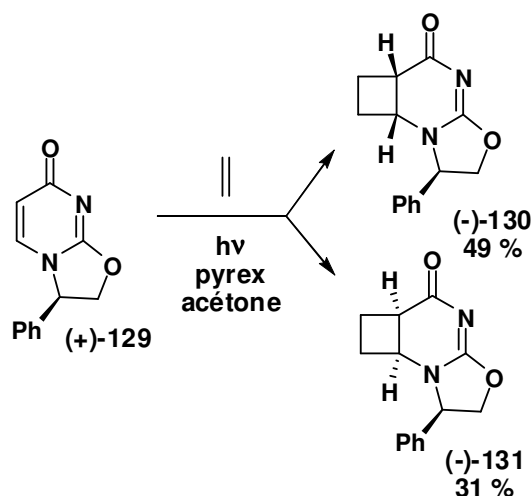


Schéma 31

Les énantiomères **(+)-127** et **(-)-127** ont été obtenus en deux étapes à partir des diastéréoisomères **(-)-130** et **(-)-131** par une hydrogénation catalytique, suivie d'un traitement avec de l'acide formique. A partir de **(+)-127** et **(-)-127**, il a suffi d'appliquer le protocole décrit en série racémique pour accéder aux énantiomères **(+)-cis-105** et **(-)-cis-105** avec des rendements globaux respectifs de 63 et 69 %, et des excès énantiomériques supérieurs à 97 %. Ce travail fait parti des recherches doctorales de C. Gauzy⁹⁰ et a été communiqué en 2004 (Schéma 32)⁹¹.

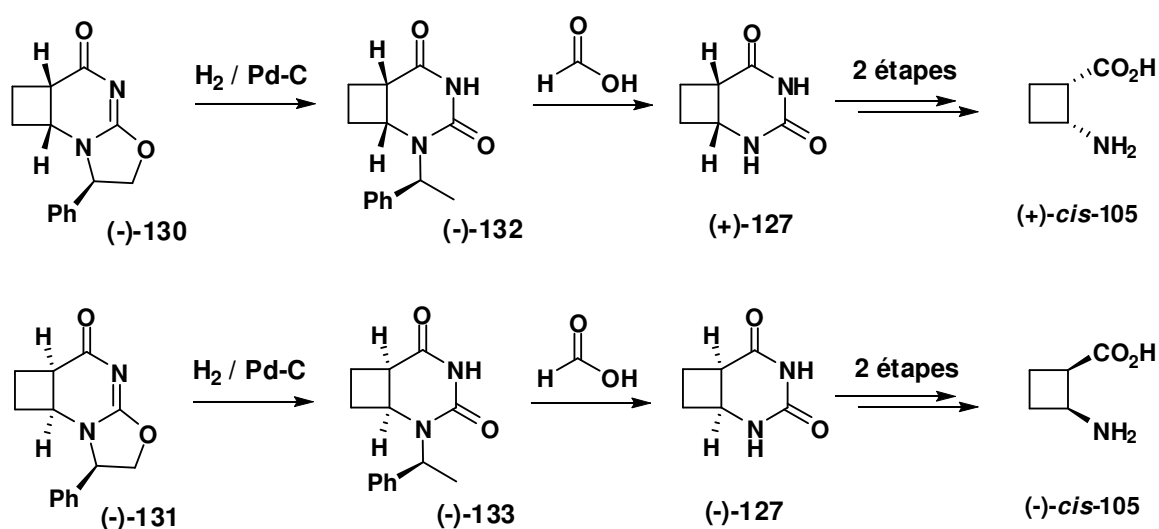


Schéma 32

⁹⁰ Thèse Christine Gauzy, n° 374, soutenue le 16 janvier 2003 – Université Blaise Pascal – Clermont-Ferrand

⁹¹ Gauzy, C. ; Pereira, E. ; Faure, S. ; Aitken, D. J. *Tetrahedron Lett.* **2004**, 45, 7095-7097

II-1^{ère} METHODE D'ACCES AUX 4 STEREOISOMERES DE L'ACBC

1) Présentation de la stratégie

Au début de ce travail, le laboratoire venait de publier une approche photochimique pour accéder au *cis*-ACBC racémique⁸⁸, puis, une adaptation diastéréosélective *via* l'apport d'un inducteur chiral porté sur la partie uracile⁹¹. (section 3.c, p. 61). A partir de cette synthèse diastéréosélective qui permet d'accéder aux 2 énantiomères du *cis*-ACBC, nous avons continué le travail entamé au sein du laboratoire pour accéder aux énantiomères du *trans*-ACBC, ce qui constituait notre premier objectif.

Dans la littérature, il est rapporté des méthodes d'épimérisation de dérivés de β -aminoacides carbocycliques, et chaque méthode est adaptée au dérivé engagé dans la réaction.

Par soucis d'économie du matériel énantiopur qui est accessible en quantité limité, nous avons naturellement mené notre étude d'obtention des isomères *trans*-ACBC **110** sur la version racémique, pour être ensuite appliquer sur la version énantiopure.

Notre stratégie reposait sur les intermédiaires de la voie racémique (Schéma 33). Dans cette synthèse, nous avons 3 intermédiaires potentiels à partir desquels nous pouvions tenter une épimérisation :

- sur l'adduit photochimique (\pm)-**127**
- sur l'uréidoacide (\pm)-**128**
- sur l'aminoacide *cis*-ACBC (\pm)-**105**

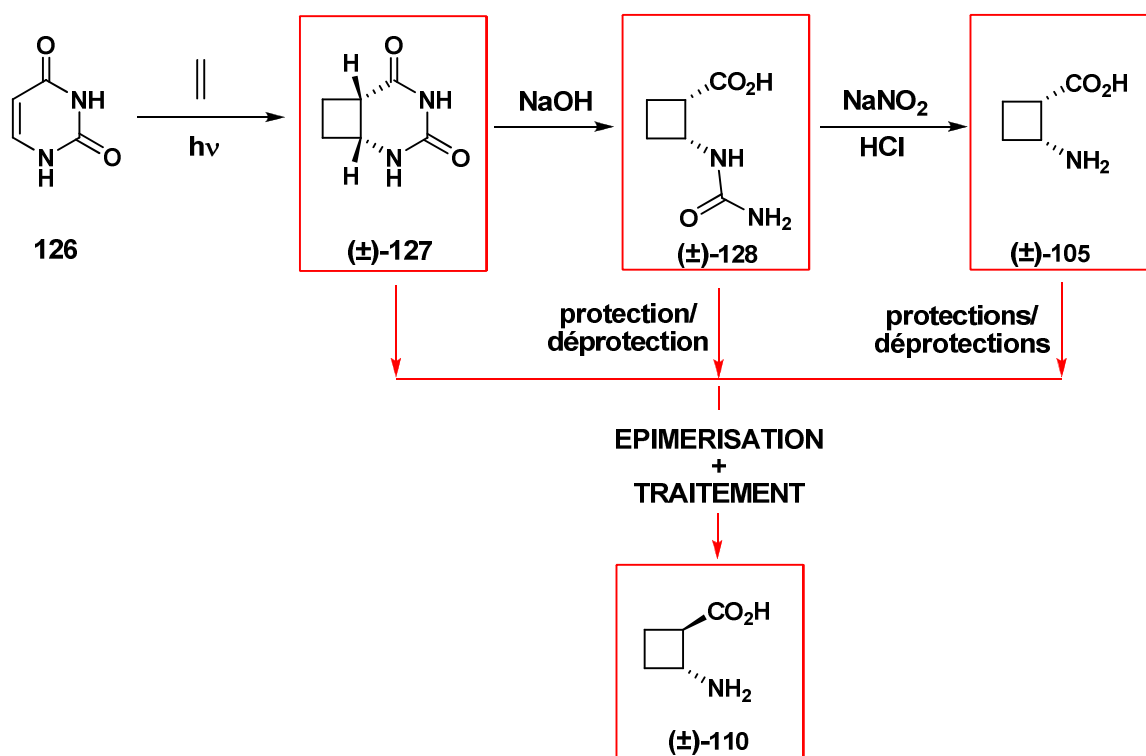


Schéma 33

Selon l'intermédiaire étudié pour l'épimérisation, nous avons envisagé la protection de fonctions afin d'éviter toute réaction non-désirée.

2) Etudes en série racémique

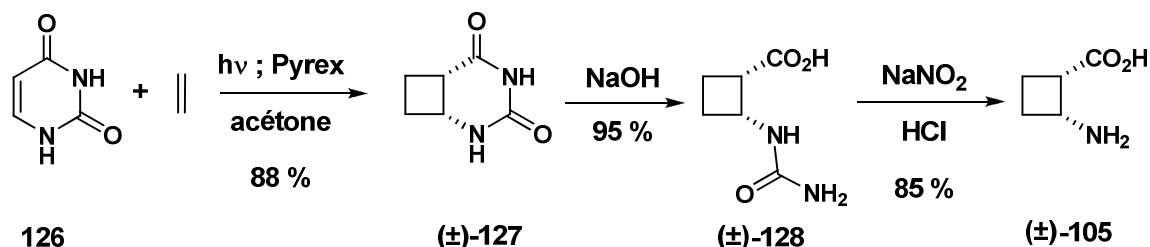
a) Synthèse du cis-aminoacide (±)-105

Nous avons utilisé les modes opératoires publiés par Gauzy *et al.*⁸⁸ pour la synthèse du racémique (±)-105 (Schéma 34). L'adduit cyclobutanique (±)-127 a été obtenu par photocycloaddition [2+2] entre l'éthylène et l'uracile avec un rendement de 88 % (Figure 53).



Figure 53

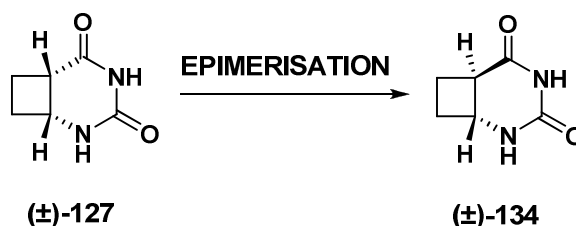
Ensuite, l'ouverture du bicyclic a été réalisée par action de la soude pour former l'uréidoacide (**±**)-**128** avec 95 % de rendement. La diazotation de la fonction urée du composé (**±**)-**128** a conduit à l'acide aminé désiré (**±**)-**105** avec un rendement global de 71 % à partir de l'uracile **126**.



Par le biais de cette synthèse, nous avons pu constater l'instabilité du cyclobutane de l'acide aminé (**±**)-**105**, lorsque l'amine en β n'est pas protégée par une fonction qui désamorce l'effet "push-pull"⁷⁵.

b) Etudes sur l'épimérisation de l'adduit bicyclique (**±**)-**127**

L'épimérisation de l'adduit cyclobutanique (**±**)-**127** serait intéressante puisqu'elle éviterait les étapes de protection et déprotection incontournables dans les deux autres stratégies (Schéma 35).



Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux décrits par Priego *et al.*⁶⁹ sur la synthèse de β -aminoacides cyclohexaniques (Schéma 36). Les auteurs ont épimérisé le composé bicyclique **cis-61**, en présence de *tert*-butanolate de potassium en proportion stœchiométrique et à reflux du solvant. Ainsi, le composé **trans-135** a été isolé avec un rendement de 80 %.

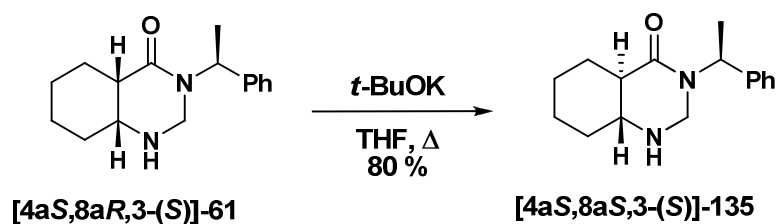


Schéma 36

Nous avons ainsi tenté d'épimériser l'adduit cyclobutanique (**±**)-**127** dans les conditions décrites par les auteurs, c'est-à-dire, un équivalent de *tert*-butanolate de potassium dans le THF à reflux (Schéma 37). Cependant, lors de la réaction, nous n'avons observé aucune évolution du système et nous avons pu récupérer le produit de départ. Le nombre d'équivalents de *tert*-butanolate de potassium a alors été augmenté (3 éq.), toujours à reflux THF, mais sans entraîner de changement.

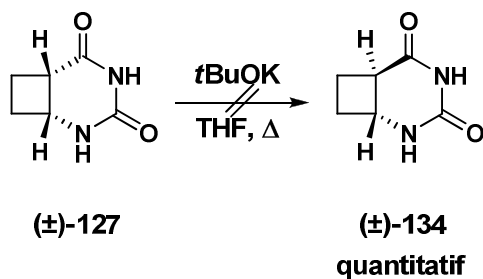


Schéma 37

Compte tenu de ces observations, nous avons changé la base. La réaction d'épimérisation a alors été tentée avec un équivalent d'hydruure de sodium dans le THF à reflux. Au bout d'une heure, nous avons observé une dégradation du matériel de départ (Schéma 38).

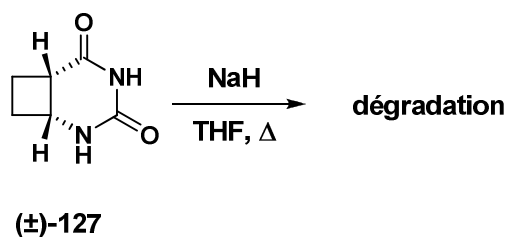


Schéma 38

Ces résultats nous montre la difficulté à épimériser le composé bicyclique (**±**)-**127** et donne à penser que l'argument thermodynamique pour la reprotonation de l'énolate serait en faveur de la configuration *cis*.

c) Etudes sur l'épimérisation de l'uréidoacide (±)-128

Nous avons poursuivi notre étude pour des tentatives d'épimérisation d'un dérivé de l'uréidoacide (±)-128 pour accéder au composé (±)-136 (Schéma 39).

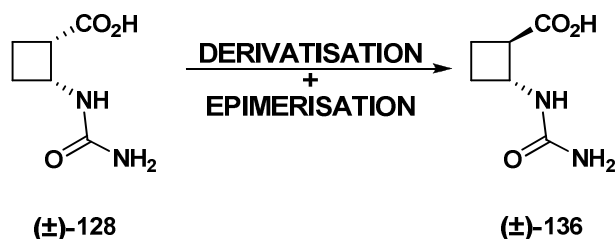


Schéma 39

En 1990, Katagiri *et al.* ont décrit l'épimérisation d'une série de dérivés du *cis*-uréidoester de méthyle (±)-137 substitués en position 3⁹². L'épimérisation des dérivés de (±)-137 a été réalisée en présence de méthanolate de sodium dans le méthanol et à température ambiante. Les rendements d'épimérisation étaient compris entre 22 et 98 % (Schéma 40). Cependant, aucun mode opératoire n'a été détaillé par les auteurs.

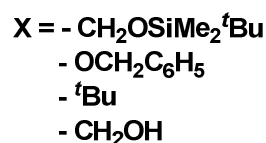
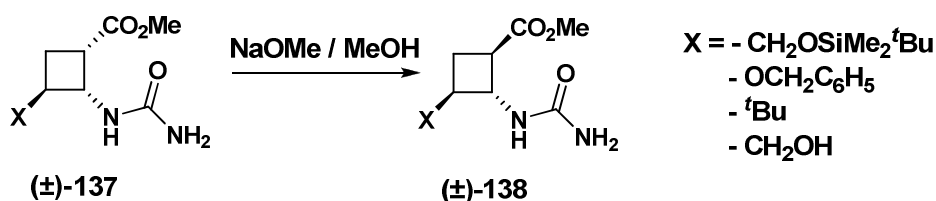


Schéma 40

Nous avons donc décidé d'utiliser cette méthode d'épimérisation, et pour cela, il a fallu préparer l'uréidoester de méthyle.

i) Synthèse de l'ester de méthyle (±)-139

L'ester de méthyle (±)-139 a été préparé à partir du composé (±)-128, en présence de 2,1 équivalents de chlorure de triméthylsilyle (TMSCl) dans le méthanol, avec un rendement de 75 %⁹³ (Schéma 41).

⁹² Katagiri, N.; Sato, H.; Kanero, C. *Chem. Pharm. Bull.* **1990**, *38*, 388-290

⁹³ Hanessian, S.; Moitessier, N.; Cantin, L-D. *Tetrahedron* **2001**, *57*, 6885-6890

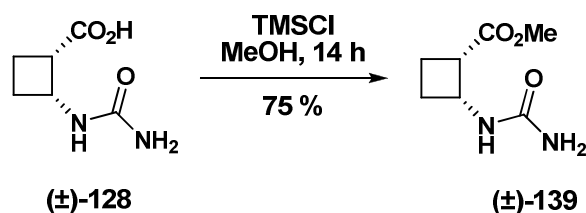


Schéma 41

ii) Epimérisation de l'urédoester (±)-139

Nous avons traité l'urédoester (±)-139 avec 5 équivalents de méthanolate de sodium dans le méthanol et à température ambiante (Schéma 42). Après 2 heures d'agitation, nous avons constaté la disparition totale du réactif de départ et l'apparition d'un nouveau produit (Tableau 4, entrée 1). L'analyse par RMN du nouveau produit a permis d'identifier celui-ci comme étant le composé bicyclique (±)-127, isolé avec un rendement de 93 %. Le composé (±)-139 a été de nouveau mis en réaction avec 1 équivalent de méthanolate de sodium dans le méthanol (Tableau 4, entrée 2), et au bout de 18 heures, le composé bicyclique (±)-127 était largement majoritaire dans un mélange avec le produit de départ.

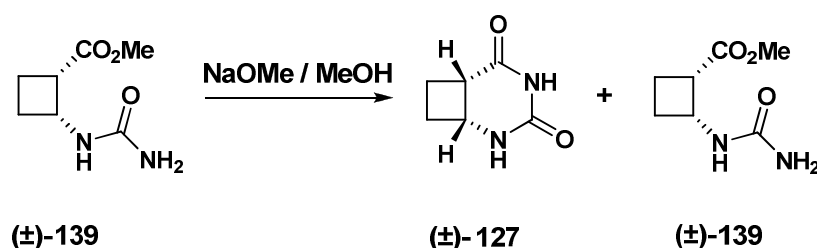


Schéma 42

NaOMe (équ.)	Temps (h)	Rapport 127/139	Rendement 127 (%)
5	2	100/0	93
1	18	90/10	90

Tableau 4

Il semble que le proton en α de l'ester ne soit pas suffisamment acide ($pK_a \approx 25$) par rapport à celui de l'urée monosubstituée ($pK_a < 25$) pour être arraché quelle que soit la force de la base utilisée. Par conséquent, la réaction de cyclisation est plus rapide que l'épimérisation.

Ce phénomène avait été observé par Katagiri *et al.*⁹² sur le composé **140** substitué par un éther de silyle en position 3 du cyclobutane. Les auteurs ont, dans ce cas, isolé le composé

141 et le composé bicyclique **142** correspondant avec un rendement de 62 % et de 24 % respectivement (Schéma 43).

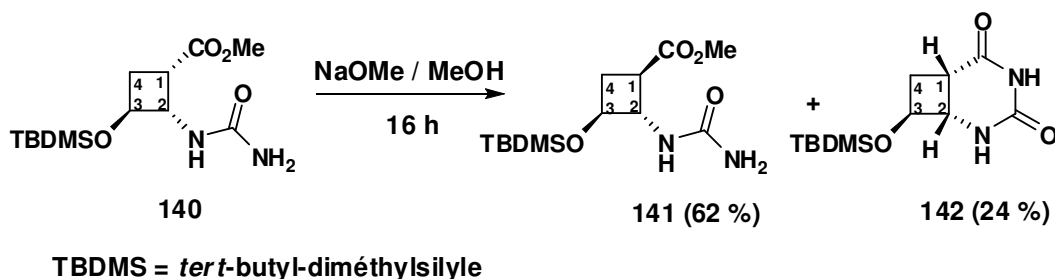


Schéma 43

d) Etudes sur l'épimérisation de l'acide aminé (±)-**105**

Nous avons envisagé d'obtenir le *trans*-ACBC (±)-**110** à partir de son isomère *cis*-ACBC (±)-**105**. Par une analyse rétro-synthétique, l'acide aminé (±)-**110** serait obtenu par déprotection de l'intermédiaire **143**, lequel serait formé par l'épimérisation de son isomère **144**. Enfin, lui-même, serait obtenu par protection orthogonale de l'acide aminé (±)-**105** (Schéma 44). Cette protection orthogonale est capitale lorsqu'on veut réaliser à terme des couplages peptidiques entre deux motifs acides aminés. Cela permet de déprotéger sélectivement l'un ou l'autre des groupements protecteurs.

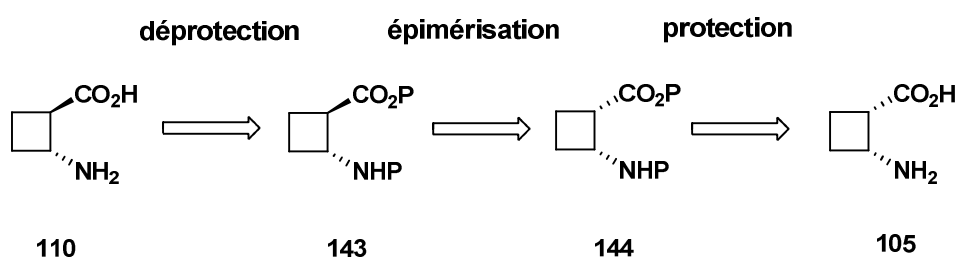


Schéma 44

Davies *et al.* ont réalisé une épimérisation des composés *cis*-ACPC ($n=1$) et *cis*-ACHC ($n=2$) diprotégés, afin d'accéder aux composés de configuration relative *trans* avec de bons rendements d'épimérisation⁶³ (Schéma 45).

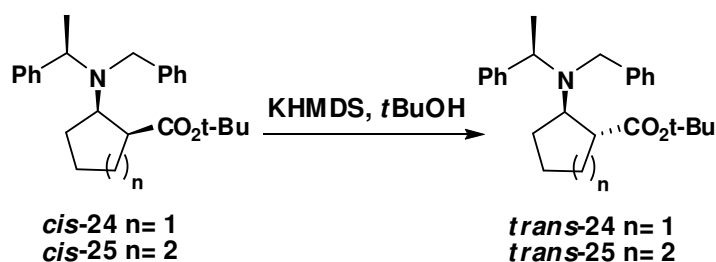


Schéma 45

Gellman *et al.* ont travaillé sur l'épimérisation du *cis*-ACHC protégé sous forme d'ester de méthyle pour l'acide et par le groupement tert-butoxycarbonyl pour l'amine⁹⁴. Les auteurs ont choisi cette stratégie de protection afin de pouvoir éliminer sélectivement l'un ou l'autre des groupements, en vue de réaliser des couplages peptidiques. Le méthanolate de sodium dans le méthanol à reflux ont été les conditions retenues par ces auteurs pour l'épimérisation du composé **cis-145**, et ont permis d'isoler l'isomère **trans-146** avec un rendement maximum de 70 % (Schéma 46).

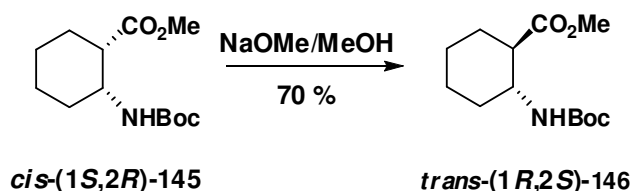


Schéma 46

Comme notre second objectif était de réaliser des couplages peptidiques entre des dérivés du *trans*-ACBC, nous avons retenu les groupements protecteurs utilisés par Gellman *et al.* pour tenter l'épimérisation du *cis*-ACBC.

i) Protection de l'acide aminé (±)-105

Nous avons mis au point deux voies d'accès complémentaires pour parvenir au composé diprotégé (±)-147 à partir de l'acide aminé (±)-105 (Schéma 47). Ces deux voies sont basées sur l'ordre de protection des groupements fonctionnels.

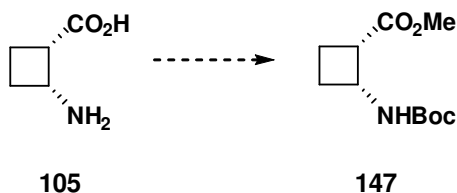


Schéma 47

⁹⁴ Appella, D. H. ; LePlae, P. R. ; Raguse, T. L. ; Gellman, S. H. *J. Org. Chem.* **2000**, *65*, 4766-4769

- Première voie

L'acide aminé **(±)-105** a été d'abord protégé sur l'acide par réaction avec le TMSCl dans le méthanol pour former le chlorhydrate de l'aminoester **(±)-148**⁹⁵. Celui-ci a été directement engagé dans la réaction suivante, en présence de Boc₂O et de triéthylamine pour accéder au composé **(±)-147** avec un rendement de 70 %⁹⁶ (Schéma 48). Si le composé **(±)-148** n'a pas été isolé, c'est parce que Ortuño *et al.* ont décrit auparavant⁸⁶, l'instabilité de ce composé pour former le produit d'ouverture issu du push-pull (*cf.* section 3.a, p.54).

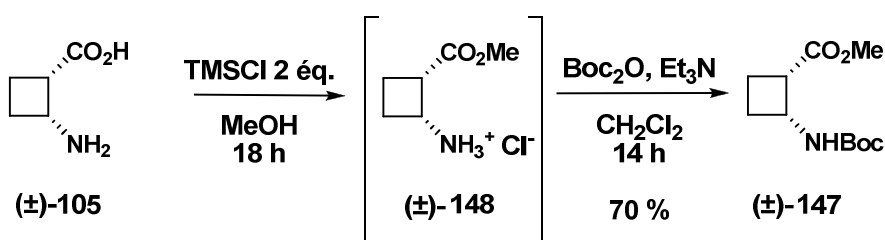


Schéma 48

- Seconde voie

Dans la seconde voie, l'amine **(±)-105** a été traitée avec du Boc₂O et de la soude dans un mélange binaire eau/dioxane pour donner le carbamate-acide **(±)-149** quantitativement⁹⁷ (Schéma 49). Ensuite, cet acide a été estérifié en présence de DCC, de DMAP et de méthanol⁹⁸ dans le chlorure de méthylène pour isoler le composé diprotégé **(±)-147** avec un rendement global de 93 %.

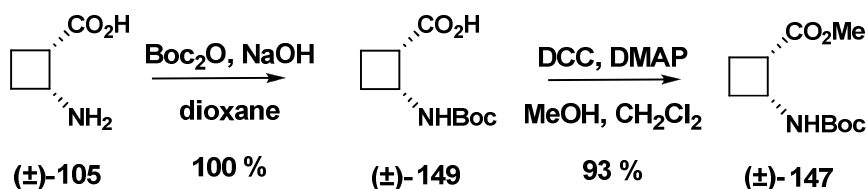


Schéma 49

La comparaison des deux voies d'accès au composé **(±)-147** nous a conduit à choisir la seconde voie pour deux raisons : le rendement global est plus élevé et nous évitons le passage par l'aminoester **(±)-148** instable. Par conséquent, cette voie a été utilisée pour l'approvisionnement du composé **147** pour les synthèses racémique et stéréosélective du *trans*-ACBC.

⁹⁵ Chen, B.-C. ; Skoumbourdis, A. P. ; Guo, P. ; Bednarz, M. ; Kocy, O. R. ; Sundeen, J. E. ; Vite, G. D. *J. Org. Chem.* **1999**, *64*, 9294-9296

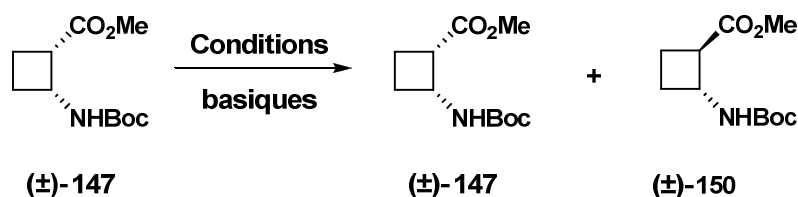
⁹⁶ Roberts, J. L. ; Chan, C. *Tetrahedron Lett.* **2002**, *43*, 7679-7682

⁹⁷ Fülöp, F. ; Palko, M. ; Forro, E. *Eur. J. Org. Chem.* **2005**, 3124-3220

⁹⁸ Neises, B. ; Steglich, W. ; *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **1978**, *17*, 522-523

ii) Epimérisation de l'ester (±)-147

L'épimérisation du *cis*-ester (±)-147 est l'étape clé dans cette approche à la synthèse du *trans*-aminoacide (±)-110. Il était donc important de définir au mieux les conditions d'épimérisation qui conduisent au *trans*-ester (±)-150 avec une bonne conversion et sans perte de matériel. Ainsi, nous avons testé différentes conditions inspirées par des protocoles décrits dans la littérature^{63,69} (Tableau 5).



Entrée	Base	Solvant	T (°C)	Temps	(±)-147 (%)	(±)-150 (%)
1	LiHMDS (4 éq.)/ ^t BuOH (8 éq.)	THF	t.a.	24 h	0	0
2	^t BuOK (2 éq.)	THF	t.a.	24 h	0	0
3	DBU (5 éq.)	DMF	t.a.	24 h	100	0
4	DBU (5 éq.)	DMF	100	18 h	0	24
5	NaH (1,1 éq.)	THF	reflux	0,5 h	0	20
6	NaOMe (5 éq.)	MeOH	t.a.	36 h	13	40
7	NaOMe (5 éq.)	MeOH	reflux	1 h	12	47

Tableau 5

Tout d'abord, nous avons testé la méthode décrite par Davies *et al.*⁶³ mettant en jeu un excès de LiHMDS et de *tert*-butanol dans le THF à température ambiante (entrée 1). Les auteurs utilisent ces conditions de réaction pour épimériser les carbamate-esters *cis*-24 et *cis*-25 (*cf.* schéma 45). Les résultats observés pour ses derniers ne sont pas reproductibles sur le cyclobutane puisque le composé (±)-147 est totalement dégradé.

Nous avons également testé la méthode décrite par Priego *et al.*⁶⁹, qui épimérise ses composés bicycliques avec un excès de *tert*-butanolate de potassium dans le THF à reflux (*cf.* schéma 36). Après 24 heures d'agitation, le *cis*-ester (±)-147 de départ est totalement dégradé sans voir la formation de son épimère (entrée 2).

Ensuite, l'épimérisation avec le DBU a montré qu'à température ambiante, il n'y avait pas eu d'évolution du système⁹⁹. Par contre, lorsque le milieu a été porté à 100 °C pendant 18 heures, nous avons obtenu **(±)-150** avec un rendement maximum de 24 % (entrée 3 et 4).

Nous avons également tenté d'épimériser le composé **(±)-147** avec l'hydrure de sodium à reflux dans le THF¹⁰⁰ (entrée 5). Dans ce cas, la réaction se fait dans un temps très court, mais il en résulte un rendement de 20 % en composé **(±)-150**, accompagné de la disparition du matériel de départ.

Enfin, nous avons réalisé l'épimérisation de **(±)-147** avec du méthanolate de sodium dans le méthanol (entrée 6 et 7). Cette méthode a été utilisée par Gellman *et al.* pour épimériser le *cis*-ACHC diprotégé **(+)-(1*S*,2*R*)-145** avec un rendement maximum de 70 % (*cf.* schéma 46)⁹⁴. Au cours de notre étude, nous avons réalisé un premier essai à température ambiante. Après 36 heures d'agitation, le composé **(±)-150** est obtenu avec un rendement maximum de 40 % (entrée 6). Ensuite, nous avons réalisé plusieurs essais à reflux, en faisant varier le nombre d'équivalents de méthanolate de sodium et le temps de réaction. Le résultat pour cette réaction a été obtenu avec un rendement de 47 % pour une heure de reflux en présence de 5 équivalents de NaOMe (entrée 7). En complément, que la réaction soit menée à température ambiante ou à reflux, une partie de l'ester de départ **(±)-147** est récupérée en fin de réaction.

En conclusion de cette étude menée sur les conditions d'épimérisation de **(±)-147**, nous avons pu montrer que certaines méthodes d'épimérisation utilisées pour des dérivés cycliques à 6 et 5 chaînons, ne sont pas adaptables aux composés cyclobutaniques, et entraîne même parfois une dégradation du substrat **(±)-147**. Nous avons également montré que l'utilisation de DBU ou bien de NaH offre l'acide **(±)-150** avec un rendement faible. En revanche, l'utilisation du protocole décrit par Gellman *et al.* nous a permis d'isoler le composé **(±)-150** avec des rendements corrects.

La caractérisation du composé **(±)-150** par la RMN 1D et 2D (¹H, COSY, ¹³C, HSQC), par spectrométrie de masse et par micro-analyse, nous a permis d'établir sans équivoque qu'il s'agissait bien du *trans*-carbamate-ester **(±)-150**, isomère du composé **(±)-147**.

⁹⁹ Yu, C-M. ; Lee, J-Y. ; Chun, K. ; Lee, J. ; Lee, Y-A. *J. Chem. Soc. Perkin Tran. 1*, **2000**, 21, 3622-3626

¹⁰⁰ Yi Yang, Rapport d'activité 2004, laboratoire SEESIB, Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand

Parmi les méthodes d'accès au composé **(±)-150**, nous avons retenu la méthode utilisant le méthanolate de sodium dans le méthanol à reflux (entrée 7), pour son application ultérieure en série énantio pure.

iii) Déprotection de l'acide-amino **(±)-150**

La déprotection du carbamate-ester **(±)-150** ne devait pas être difficile en dépit de la réactivité du cyclobutane. Nous avons déprotégé le composé **(±)-150** en deux étapes.

Dans un premier temps, la fonction ester du composé **(±)-150** a été hydrolysée avec un équivalent de lithine dans un solvant binaire THF/eau pour donner l'acide-carbamate **(±)-151** quantitativement (Schéma 50). La caractérisation du composé **(±)-151** nous a apporté une confirmation supplémentaire sur la nature de la configuration relative, par comparaison avec le carbamate-acide **(±)-149**.

Ensuite, le composé **(±)-151** a été traité par l'acide trifluoroacétique dans le dichlorométhane pour former l'ammonium correspondant qui, après purification a fourni le *trans*-aminoacide **(±)-110** avec un rendement de 85 %. Cet aminoacide a été obtenu sous forme de cristaux blancs et a montré une stabilité à l'air ainsi qu'en solution aqueuse. La caractérisation que nous avons réalisée de ce composé, est en accord avec les données décrites par Kennewell en 1982⁸².

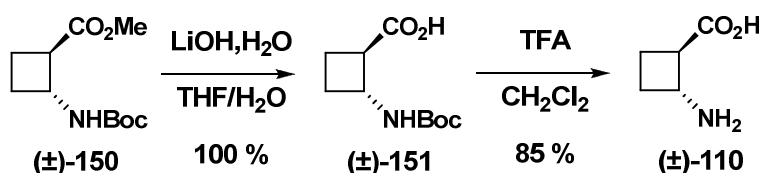
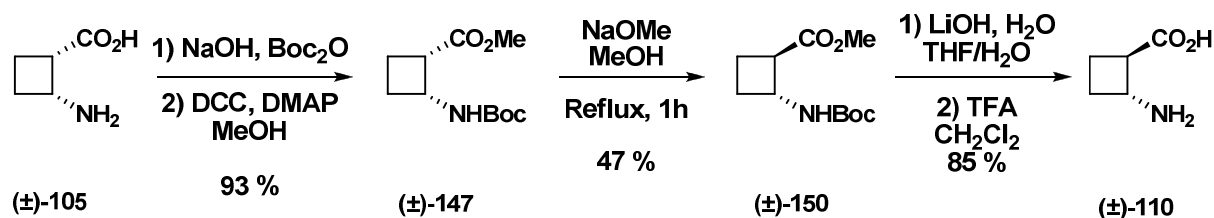


Schéma 50

e) Bilan de la synthèse racémique

Au début de ce chapitre, lorsque nous avons présenté la stratégie pour accéder au *trans*-ACBC **(±)-110**, nous avons envisagé trois intermédiaires possibles : le composé bicyclique **(±)-127**, l'uréidoacide **(±)-128** et enfin l'aminoacide **(±)-105**. Les deux premiers intermédiaires n'ont malheureusement donné aucun résultat concluant. Par contre, à partir du *cis*-ACBC **(±)-105**, nous avons mis au point une méthode d'accès au *trans*-ACBC **(±)-110**, en 5 étapes et avec un rendement global de 37 %. Cette méthode nécessite au préalable la protection

orthogonale des fonctions acide et amine de **(±)-105**, l'épimérisation du composé diprotégé **(±)-147** et enfin la double déprotection de ce dernier pour conduire au **trans-(±)-110** (Schéma 51).

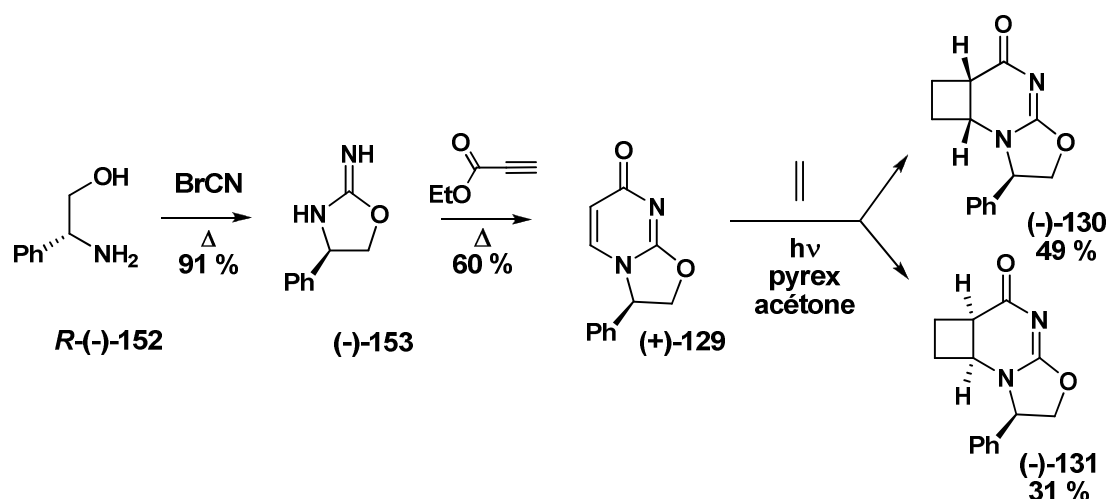


Un des avantages de cette voie de synthèse est l'obtention du composé **(±)-150** orthogonalement protégé qui peut être directement engagé dans la synthèse d'oligomères du *trans*-ACBC par déprotection sélective de l'amine ou de l'acide.

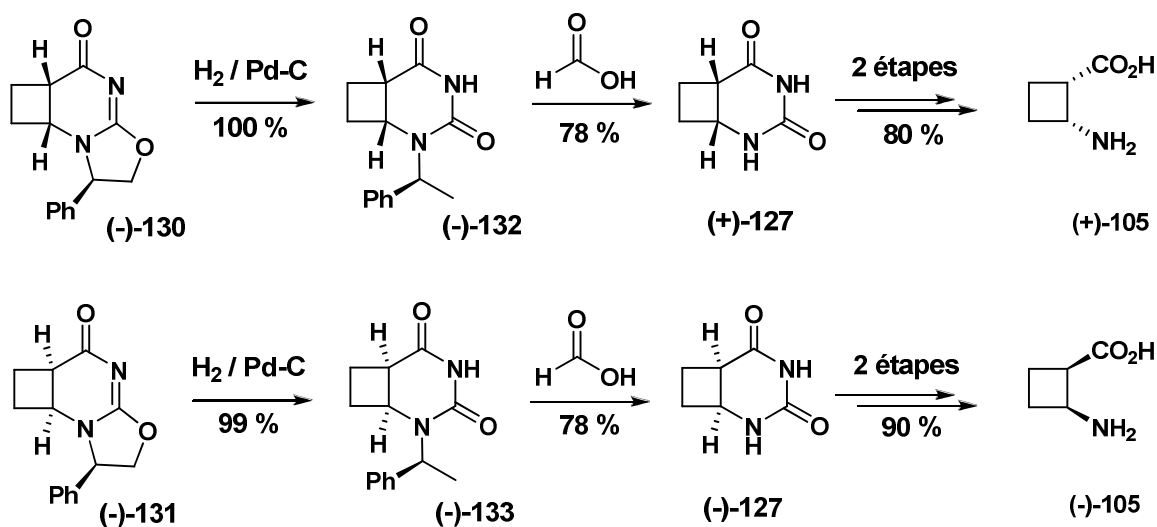
3) Application à la synthèse des β -aminoacides énantiomériquement purs

Après avoir mis au point le protocole d'accès au *trans*-ACBC sur série racémique, nous sommes passés à l'application en série énantiopure. Pour cela, nous avons repris la synthèse diastéréosélective développée au laboratoire pour fournir les deux énantiomères **cis-(+)-(1*S*,2*R*)-105** et **cis-(-)-(1*R*,2*S*)-105**^{88,91} (Section c.iii, p. 62).

Ainsi, à partir du *R*-(-)-phénylglycinol **(-)-152**, nous avons préparé les deux diastéréoisomères **(-)-130** et **(-)-131** en 3 étapes, avec un rendement global de 43 % et une diastéréosélectivité de 60:40 (Schéma 52).



Une fois les deux diastéréoisomères séparés par chromatographie, nous les avons engagés dans une suite réactionnelle en 4 étapes pour finalement isoler le **cis-(+)-(1*S*,2*R*)-105** et le **cis-(-)-(1*R*,2*S*)-105** avec un rendement global respectif de 63 et 69 % (Schéma 53). Chaque énantiomère a une pureté optique supérieure à 97 % définie par chromatographie chirale (*cf.* partie expérimentale). Arrivés à ce stade, nous avons le matériel de départ pour parvenir aux 2 énantiomères du *trans*-ACBC **110**.



Nous avons alors appliqué la méthodologie mise au point précédemment sur la série racémique (Schéma 54). A partir de chaque énantiomère de l'acide aminé **105**, nous avons réalisé la double protection, épimérisé les composés diprotégés, et enfin retiré les groupements protecteurs pour fournir le **trans-(-)-(1*R*,2*R*)-110** et **trans-(+)-(1*S*,2*S*)-110** avec des rendements respectifs de 44 et 24 %. Les excès énantiomériques de **(1*R*,2*R*)-110** et

(1*S*,2*S*)-**110** ont été déterminés par HPLC sur colonne chirale pour fournir une pureté énantiomérique supérieure à 97 % (cf. partie expérimentale).

Les rendements d'étapes pour chaque énantiomère sont comparables aux résultats obtenus en série racémique et l'épimérisation du composé (+)-**147** a atteint un rendement de 60 %.

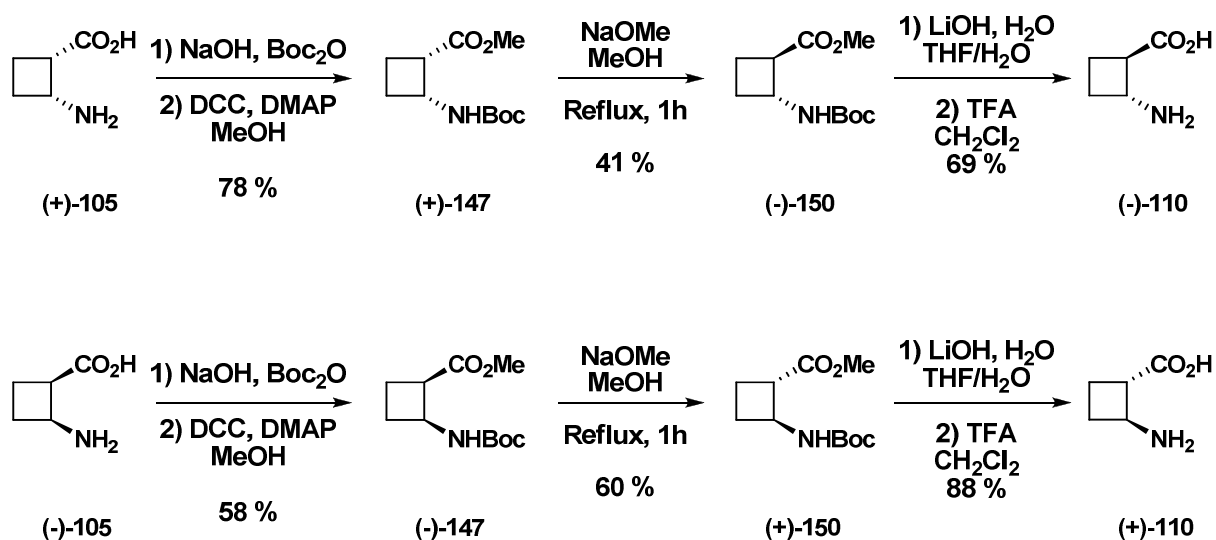


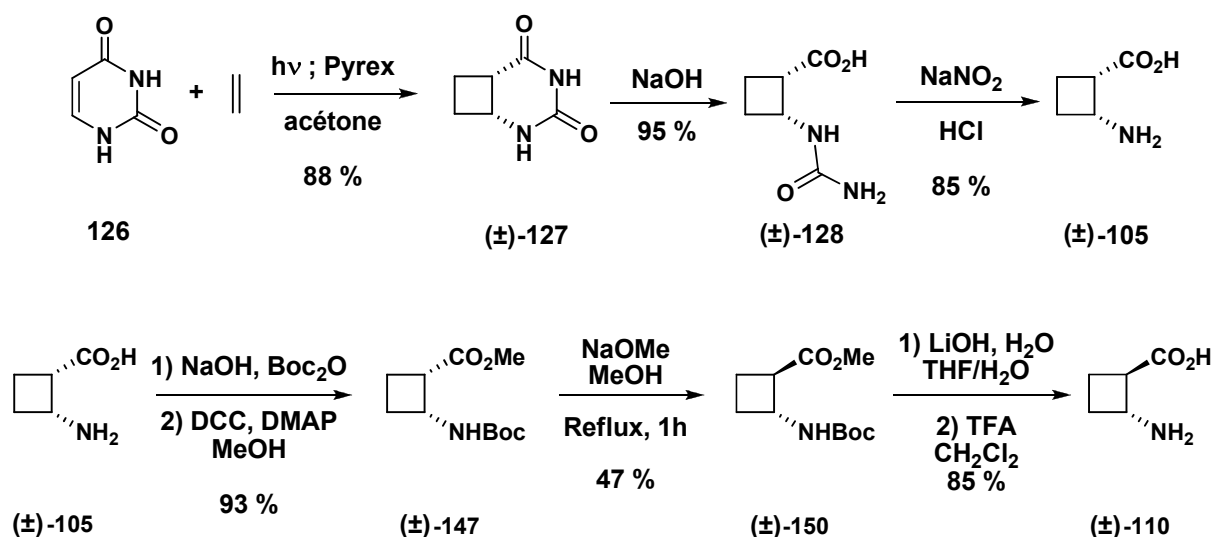
Schéma 54

A ce moment là, nous avons synthétisé pour la première fois, les énantiomères du *trans*-ACBC optiquement purs.

4) Bilan de la première méthode de synthèse

En résumé, le laboratoire a développé une méthodologie en série racémique et en série énantiopure pour accéder au *cis*-ACBC **105**. Cette méthodologie est basée sur une étape clé de photocycloaddition [2+2] pour créer le cyclobutane.

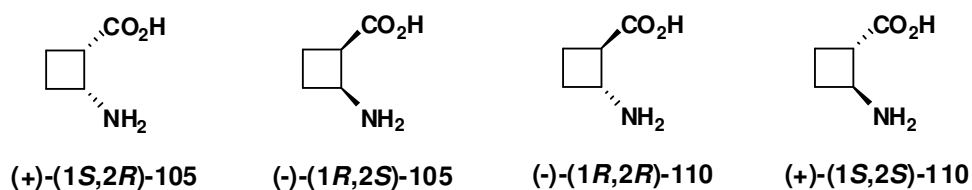
En série racémique, à partir de l'uracile, nous avons développé une voie de synthèse inédite pour parvenir au *trans*-ACBC (\pm)-**110**, en 8 étapes et avec un rendement global de 21 % (Schéma 55).



Compte tenu des résultats encourageants en série racémique, nous nous sommes dirigés sur l'application de cette méthodologie en série énantiopure. A partir du (*R*)-phénylglycinol optiquement pur, nous avons préparé en 8 étapes, le ***cis*-(+)-(1*S*,2*R*)-105** et ***cis*-(-)-(1*R*,2*S*)-105** avec un rendement global respectif de 17 et 12 % (Schéma 57). Chaque énantiomère a été engagé dans le protocole d'isomérisation pour fournir en 5 étapes les composés ***trans*-(-)-(1*R*,2*R*)-110** et ***trans*-(+)-(1*S*,2*S*)-110**. Ces derniers ont été obtenus avec des rendements globaux respectifs à partir du (*R*)-phénylglycinol de 3.7 et 3.6 %.

Chacun des stéréoisomères de l'ACBC a été isolé avec une pureté énantiomérique supérieure à 97 %, déterminée par HPLC chirale.

En résumé, à partir d'une étape clé de photocycloaddition de type [2+2] qui permet de générer le squelette cyclobutane, nous savons accéder aux 4 stéréoisomères de l'ACBC optiquement enrichis (Schéma 56).



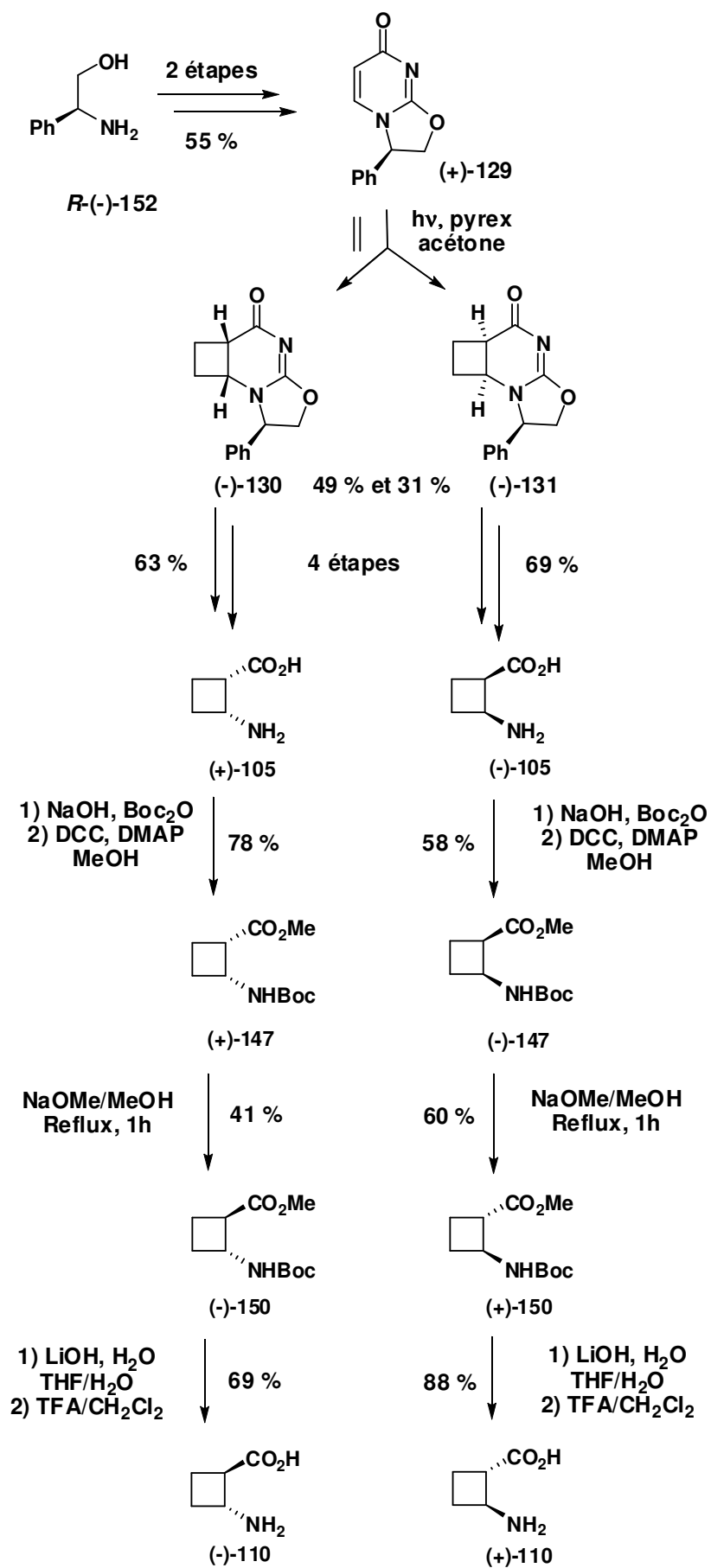


Schéma 56

III-2^{ème} METHODE D'ACCES AUX 4 STEREOISOMERES DE L'ACBC

1) Présentation de la stratégie

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit la première synthèse des deux énantiomères du *trans*-ACBC. Cette synthèse était basée sur une photocycloaddition [2+2] diastérosélective entre un partenaire ènone chirale et l'éthylène, puis sur l'épimérisation d'un dérivé diprotégé du *cis*-ACBC.

Malgré le succès de cette méthode pour obtenir les 4 stéréoisomères de l'ACBC, quelques aspects restent un handicap pour une synthèse multigramme :

- Le nombre d'étapes élevé
- Le rendement d'épimérisation modéré
- La séparation des deux diastéréoisomères (–)-130 et (–)-131

Il fallait donc une synthèse alternative qui permettrait l'accès aux stéréoisomères de l'ACBC avec, un nombre d'étapes réduit, une étape d'épimérisation optimisée et enfin un rendement global amélioré.

Nous avons donc deux objectifs, trouver un nouveau moyen d'accès aux 4 stéréoisomères de l'ACBC et également optimiser le rendement d'épimérisation.

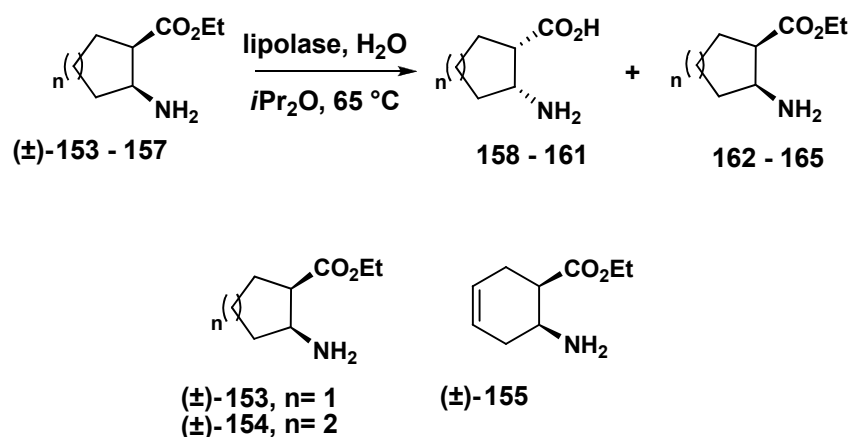
Pour notre premier objectif : nous avons envisagé une approche passant par un dédoublement racémique. Cette technique est utilisée pour obtenir des énantiomères optiquement purs et cela peut être envisagé de deux façons différentes :

- soit par dédoublement enzymatique
- soit par dédoublement diastéréoisomérique

Le dédoublement enzymatique est souvent utilisé en synthèse organique bien que cette technique n'est pas généralisable. En effet, la discrimination d'un énantiomère d'un mélange racémique peut être réalisée si l'un des énantiomères est substrat de l'enzyme. Quelques

auteurs ont décrit le dédoublement enzymatique de dérivés *cis*-ACPC¹⁰¹. Des travaux récents de Fülöp *et al.* décrivent l'hydrolyse énantiosélective de β -aminoesters alicycliques catalysée par une lipase et ceci dans un solvant organique¹⁰² (Schéma 59). Les auteurs ont montré que la lipolase de *Candida antarctica* acceptait comme substrat les aminoesters cycliques à 5 et 6 chaînons, de configuration *cis* ou *trans*, avec ou sans insaturations (**152** à **157**). Ainsi, pour les *cis*-aminoesters (**152** à **155**), la lipolase a hydrolysé sélectivement un des énantiomères pour conduire à un mélange d'acide aminé (**158** à **161**) et d'ester amino (**162** à **165**) optiquement purs. Pour les isomères de configuration *trans*, les auteurs ont obtenu les mêmes résultats uniquement pour les cycles à 6 chaînons (**156** et **157**).

Hydrolyse des isomères *cis*



Hydrolyse des isomères *trans*

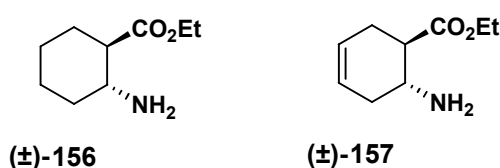


Schéma 59

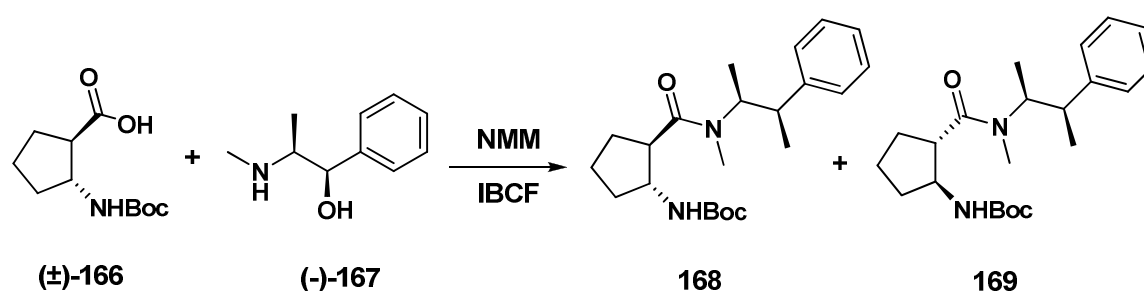
Le dédoublement diastéréoisomérique est obtenu par la formation d'un couple de diastéréoisomères issu du couplage entre une fonction organique du mélange racémique avec une copule chirale. Cette technique ne permet pas forcément d'obtenir des diastéréoisomères séparables. C'est pour cela qu'il est généralement convenu de réaliser des essais avec différentes copules chirales. Pour les diastéréoisomères séparables, il suffit

¹⁰¹ Paul R. LePlae, P. L. ; Umezawa, N. ; Lee, H-S. ; Gellman, S. H. *J. Org. Chem.* **2001**, 66, 5629-5632

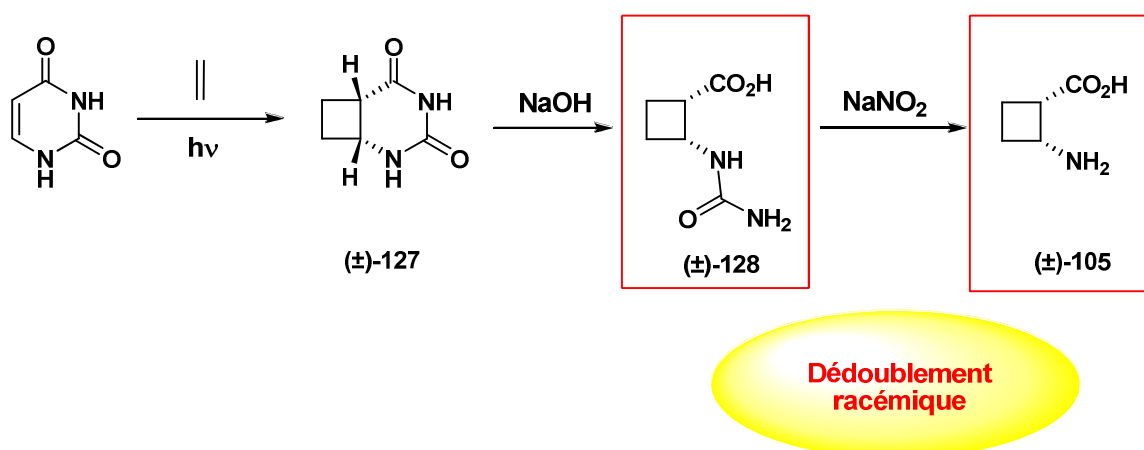
¹⁰² Forro, E. ; Fülöp, F. *Chem. Eur. J.* **2007**, 13, 6397-6401

de retirer la copule chirale par la suite, qui fournira les deux énantiomères optiquement enrichis.

Goodman *et Coll.* ont réussi à réaliser un dédoublement diastéréoisomérique en couplant le carbamate-acide **(±)-166** avec différentes amines chirales et plus particulièrement avec l'éphédrine **(-)-167** (Schéma 60)¹⁰³



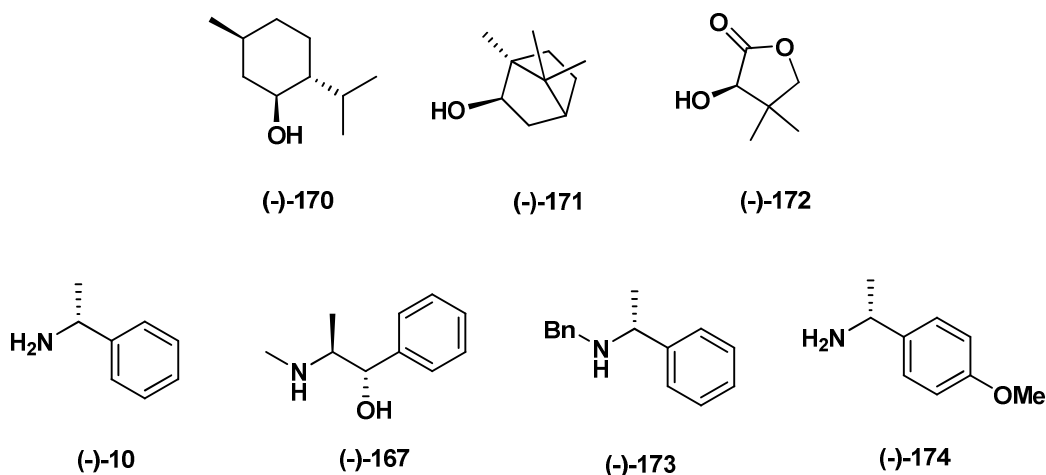
Au regard des résultats décrits dans la littérature, nous avons opté pour le dédoublement diastéréoisomérique. Notre stratégie n'était pas ciblée sur un composé en particulier de la synthèse racémique, et par conséquent, nous avons mené une étude de dédoublement sur l'uréidoacide **(±)-128** et l'aminoacide **(±)-105** (Schéma 61).



Nous avons décidé de former les diastéréoisomères *via* la fonction acide carboxylique de l'uréidoacide **(±)-128** et **(±)-105**. Notre choix s'est porté sur deux types de copules chirales : des alcools secondaires et des amines primaires et secondaires pour obtenir respectivement les esters ou les amides correspondants (Schéma 62).

¹⁰³ Yamazaki, T. ; Zhu, Y. F. ; Probstl, A. ; Chadha, K. ; Goodman, M. *J. Org. Chem.* **1991**, *56*, 6644-6655

Les alcools tertiaires sélectionnés ont été le (-)-menthol **(-)-170**, le (-)-bornéol **(-)-171** et la (-)-pantolactone **(-)-172**. Ces alcools sont peu coûteux et utilisés dans le dédoublement racémique¹⁰⁴. Les amines sélectionnées ont été : la (-)-pseudo-éphédrine **(-)-167**, la (*R*)-(-)-*N*-benzyl- α -méthylbenzylamine **(-)-173**, (*R*)-(-)- α -méthylbenzylamine **(-)-10** et enfin la (*R*)-(-)-*para*-méthoxy- α -méthylbenzylamine **(-)-174**. Ces amines sont souvent utilisées comme inducteurs chiraux en synthèse asymétrique¹⁰⁵ et comme copules pour engendrer des dédoublements racémiques^{49,103,106}.



2) Etudes de dédoublement

a) Etudes sur le dédoublement de l'uréidoacide (\pm)-128

Nous avons condensé le composé (\pm)-128 avec les alcools secondaires **(-)-170** et **(-)-171**, et l'amine primaire **(-)-10** (Schéma 63). Les résultats des différents essais sont rapportés dans le tableau 6.

¹⁰⁴ Kennedy, J. W. ; Hall, D. G. *J. Org. Chem.* **2004**, 69, 4412-4428

¹⁰⁵ Juaristi, E. ; Leon-Romo, J. L. ; Reyes, A. ; Escalante, J. *Tetrahedron Asymmetry*, **1999**, 10, 2441-2495

¹⁰⁶ Hyun, S. L. ; Dong, K. H. *Bioorg. Med. Chem.* **2003**, 11, 4685-4691

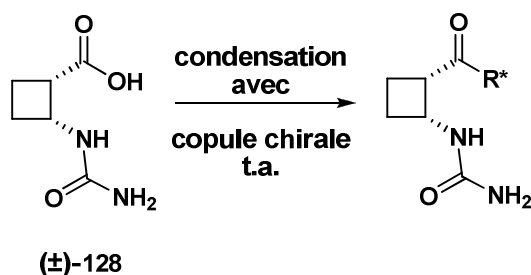


Schéma 63

Entrée	Copule chirale	Réactif de condensation	Solvant	Temps (h)	Rdt (%) _b	Produits
1	(-)-170	DCC / DMAP	DMF	16	- ^a	Mélange complexe
2	(-)-170	DCC / DMAP	CH ₃ CN	16	0	Dégradation
3	(-)-170	TMSCl	-	16	0	Pas de réaction
4	(-)-171	DCC / DMAP	DMF	16	- ^a	Mélange complexe
5	(-)-10	DCC / DMAP	DMF	16	0	Pas de réaction
6	(-)-10	DCC / DMAP	DMF	48	6 ^b	2 dia. non séparables

a) Mélange de produits non quantifiables et non séparables

b) Exprimé pour le mélange de diastéréoisomères

Tableau 6

Lorsque nous avons couplé la fonction acide de **(±)-128** avec les alcools **(-)-170** et **(-)-171** en présence du couple DCC/DMAP dans le DMF, nous avons observé la formation de plusieurs produits de réactions non séparables (entrée 1 et 4). Nous avons alors voulu étudier l'influence du solvant. La réaction a été engagée dans l'acétonitrile, ce qui a conduit à une dégradation totale du réactif de départ (entrée 2). Nous avons tenté le couplage du composé **(±)-128** avec le (-)-menthol **(-)-170** en présence de TMSCl comme agent d'activation. Dans ce cas, nous avons récupéré le produit de départ (entrée 3).

Changeant la nature de la copule chirale, nous avons mis le composé **(±)-128** en réaction avec l'amine chirale **(-)-10**. Au bout de 16 heures d'agitation, aucune réaction n'avait eu lieu (entrée 5). Après 48 heures d'agitation, nous avons pu isoler le mélange des 2 diastéréoisomères **175** et **176** désirés avec un rendement de 6 % (entrée 6). En plus d'un faible rendement, les diastéréoisomères n'ont pu être séparés (Schéma 64).

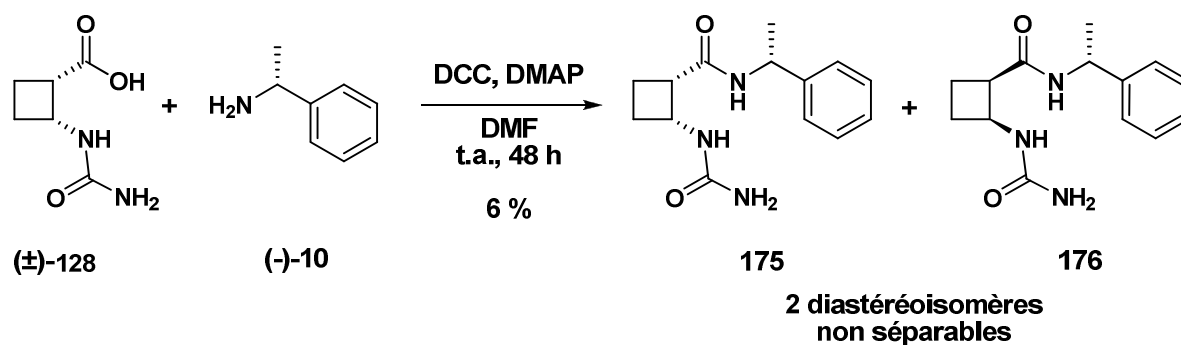


Schéma 64

Tous ces essais de dérivatisation de la fonction acide de **(±)-128** ont échoué (pas de réaction, dégradation ou obtention de diastéréoisomères non séparables). Nous nous sommes alors tournés vers notre seconde intermédiaire, l'acide aminé **(±)-105**.

b) Etudes sur le dédoublement de l'acide aminé **(±)-105**

*i) Préparation de dérivés diastéréoisomériques du composé **(±)-149***

Afin de réaliser le dédoublement racémique de l'acide aminé **(±)-105**, il était nécessaire de travailler avec la fonction amine primaire protégée de cet acide aminé. Par conséquent, nous sommes partis du carbamate-acide **(±)-149** décrit dans le chapitre précédent.

- Essais avec les alcools chiraux

Dans un premier temps, nous avons évalué le couplage de **(±)-149** avec chacun des alcools **(-)-170**, **(-)-171**, **(-)-172** (Schéma 65). Chaque réaction a été réalisée dans le chlorure de méthylène à température ambiante, en présence de DCC et de DMAP et pendant 16 heures. Les résultats de ces réactions sont présentés dans le tableau 7.

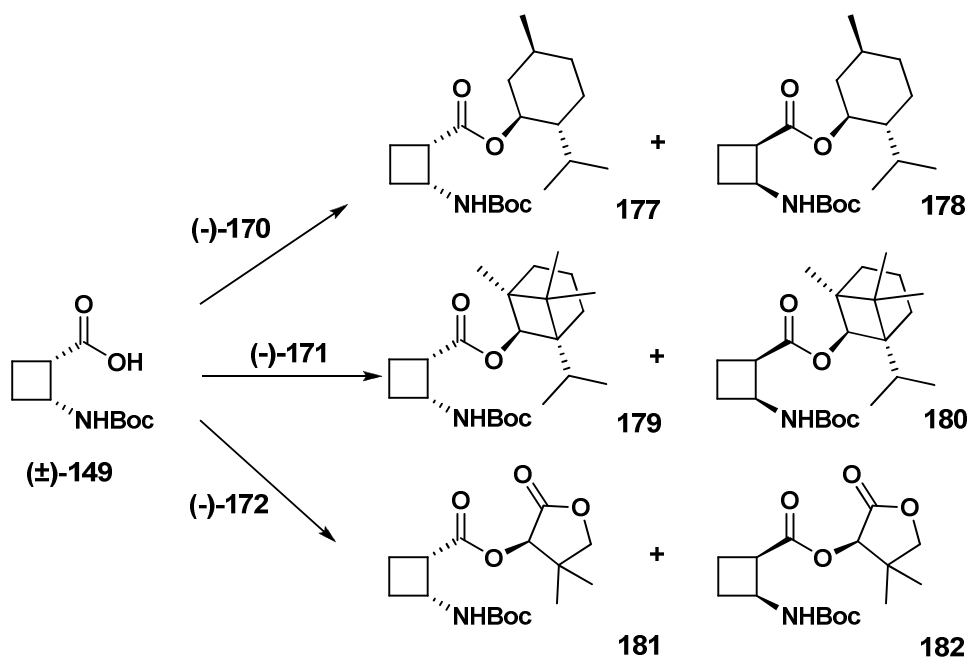


Schéma 65

Entrée	Copule chirale (éq.)	Réactifs de condensation	Rdt (%)	Produits
1	(-)-170 (3)	DCC / DMAP	72	2 dia. non séparables
2	(-)-171 (3)	DCC / DMAP	74	2 dia. non séparables
3	(-)-172 (3)	DCC / DMAP	77	2 dia. non séparables

Tableau 7

Le couplage de l'acide (±)-149 avec les différents alcools (entrée 1 à 3) a conduit à la formation des esters chiraux attendus avec de bons rendements (72 à 77 %). Cependant, les diastéréoisomères n'étaient pas séparables par chromatographie.

Nous avons constaté que l'utilisation du DCC/DMAP comme réactif de couplage a donné des produits de réactions beaucoup plus purs que ceux obtenus avec ces réactifs sur l'uréidoacide (±)-128.

- Essais avec les amines chirales

Nous avons mené en parallèle une étude sur le dédoublement diastéréoisomérique de l'acide (±)-149 avec les amines chirales (-)-10, (-)-167, (-)-173, (-)-174 (Schéma 66). Toutes les réactions sont menées dans le dichlorométhane et à température ambiante. Les résultats de ces essais sont exposés dans le tableau 8.

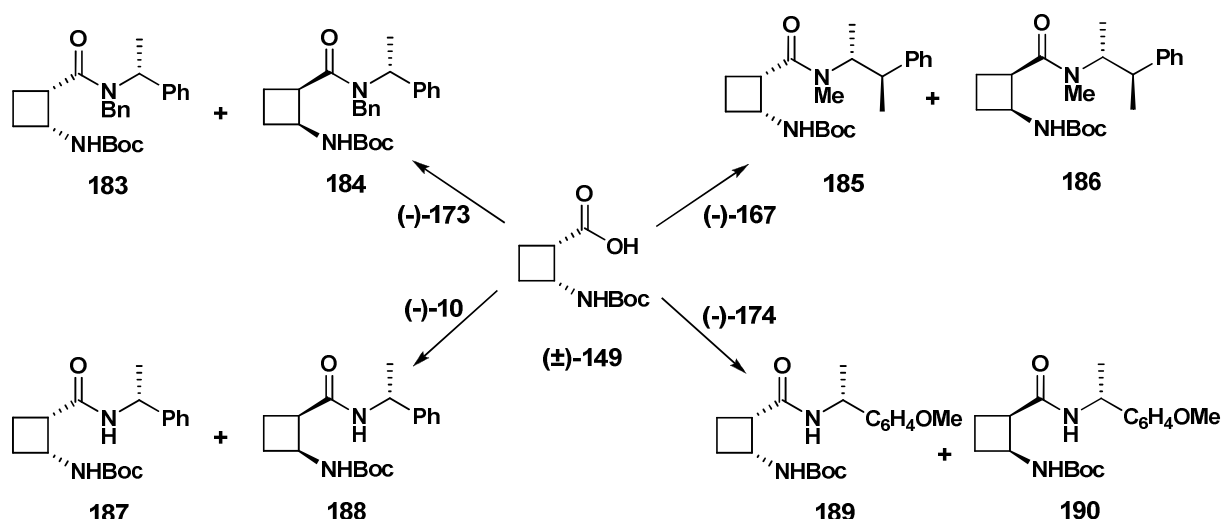


Schéma 66

Entrée	Copule chirale	Réactif de couplage	Rdt (%)	Produits
1	(-)-10	DCC / DMAP	75	2 dia. séparables
2	(-)-10	EDCI / HOBt	85	2 dia. séparables
3	(-)-174	EDCI / HOBt	83	2 dia. séparables
4	(-)-167	EDCI / HOBt	70	2 dia. non séparables
5	(-)-173	EDCI / HOBt	59	2 dia. non séparables

Tableau 8

Le couplage de l'acide **(±)-149** avec l'amine **(-)-10** en présence de DCC et de DMAP a fourni les deux amides diastéréoisomères **(+)-187** et **(+)-188** séparables par chromatographie. Chaque diastéréoisomères a été isolé avec un rendement respectif de 38 et 37 %, soit un rendement global de 75 % (entrée 1).

Nous avons simultanément étudié le couplage de **(±)-149** avec l'amine **(-)-10** en utilisant le couple EDCI/HOBt pour arriver aux composés **(+)-187** et **(+)-188** avec un rendement optimisé de 85 % (entrée 2). Le couple EDCI/HOBt présente l'avantage d'être éliminé facilement pendant les lavages acido-basiques.

Le couplage de **(±)-149** avec **(±)-174** en présence de EDCI/HOBt a permis d'isoler le couple de diastéréoisomères **(-)-189** et **(-)-190** (entrée 3). Comme précédemment, les deux diastéréoisomères on été séparés par chromatographie avec des rendements respectifs de 42 et 41 %, soit un rendement global de 83 %.

Enfin, les couplages de l'acide **(±)-149** avec les amines **(-)-167** et **(-)-173** a fourni des rendements respectifs de 70 et 59 % (entrée 4 et 5). Mais comme dans le cas des esters ci-dessus, la séparation des amides diastéréoisomères n'a pas abouti.

c) Bilan des études sur le dédoublement racémique

Nous avons tenté de condenser le composé **(±)-128** avec les alcools chiraux **(-)-170** et **(-)-171** et également avec l'amine chirale **(-)-10**. Ces essais n'ont pas donné de résultats exploitables pour le dédoublement racémique de cet intermédiaire.

Nous avons ensuite condensé le composé **(±)-149** avec différentes copules chirales dans l'optique de réaliser le dédoublement racémique de l'acide **(±)-105**. Les résultats de la condensation des alcools **(-)-170**, **(-)-171**, **(-)-172** avec **(±)-149** ont montré la formation des esters diastéréoisomères qui étaient hélas non séparables par chromatographie. Les mêmes résultats ont été observés pour la condensation de **(±)-149** avec les amines **(-)-167** et **(-)-173**.

Par contre, le couplage des amines chirales **(-)-10** et **(-)-174** avec **(±)-149** a bien conduit à la formation des amides diastéréoisomères correspondants avec de bons rendements. **(+)-187** et **(+)-188**, ainsi que **(-)-189** et **(-)-190** ont été purifiés par chromatographie pour isoler chaque diastéréoisomère optiquement pur (Schéma 67).

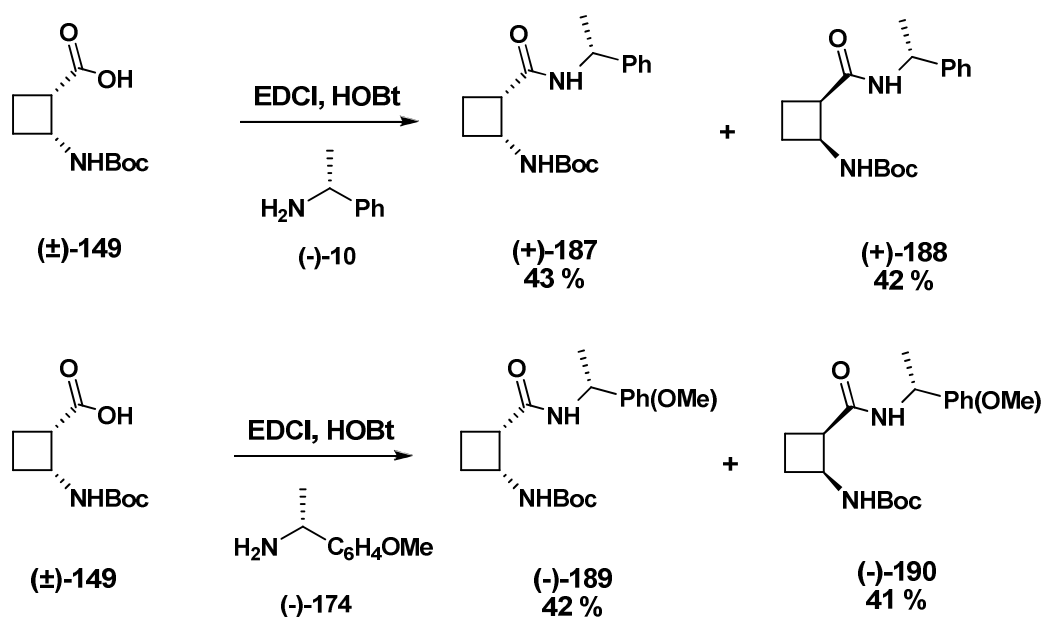


Schéma 67

L'attribution de la configuration absolue des amides **(+)-187**, **(+)-188**, **(-)-189** et **(-)-190** a pu être effectuée grâce à des analyses qui seront décrites en détail dans le chapitre suivant.

A ce moment précis, nous avons atteint la première phase de notre objectif, en réussissant le dédoublement racémique de **(±)-149**. Il fallait donc passer à la seconde phase qui consistait à hydrolyser chaque diastéréoisomère pour obtenir les énantiomères **(+)-149** et **(-)-149** optiquement purs.

3) Clivage de la copule chirale

a) Hydrolyse des amides diastéréoisomères

Dans la littérature, il existe différentes méthodes d'hydrolyse selon la classe et la nature des substituants de l'amide^{107,108}. Nous avons basé l'étude d'hydrolyse des amides diastéréoisomères uniquement sur le composé **(+)-187** (Schéma 68). Cela nous a permis de simplifier l'interprétation des résultats et en cas de succès, nous aurions vérifié la faisabilité en engageant les trois autres amides diastéréoisomères.

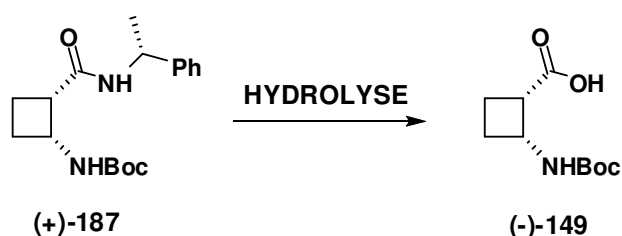


Schéma 68

i) Hydrolyse en milieu acide (HCl 6 M)

Les amides secondaires sont bien connus pour être difficilement hydrolysables en milieu acide. Cependant, il y a quelques exemples d'hydrolyse d' α -méthylbenzylamides dans la littérature, pour lesquels les conditions se déroulent en milieu acide minéral concentré et à reflux.¹⁰⁹ Goodman *et al.* ont réussi à hydrolyser les α -méthylbenzylamides **(-)-191** et **(-)-**

¹⁰⁷ Larock, R. C. *Comprehensive organic transformations*, **1988**, VCH

¹⁰⁸ Greene, T. W. ; Wuts, P. G. M. *Protective groups in Organic Synthesis*, **1999**, third edition, Wiley Interscience

¹⁰⁹ a) Cardillo, G. ; Gentilucci, L. ; Tolomelli, A. ; Tomasini, C. *J. Org. Chem.* **1998**, 63, 3458-3462, b) Richard W. Dixon, R. W. ; Radmer, R. J. ; Kuhn, B. ; Kollman, P. A. *J. Org. Chem.* **2002**, 67, 1827-1837

192, en milieu acide concentré et à reflux, pour récupérer les acides carboxyliques **(1*R*,2*R*)-1** et **(1*S*,2*S*)-1**¹⁰³. Cette hydrolyse a été réalisée avec de bons rendements et sans épimérisation (Schéma 69).

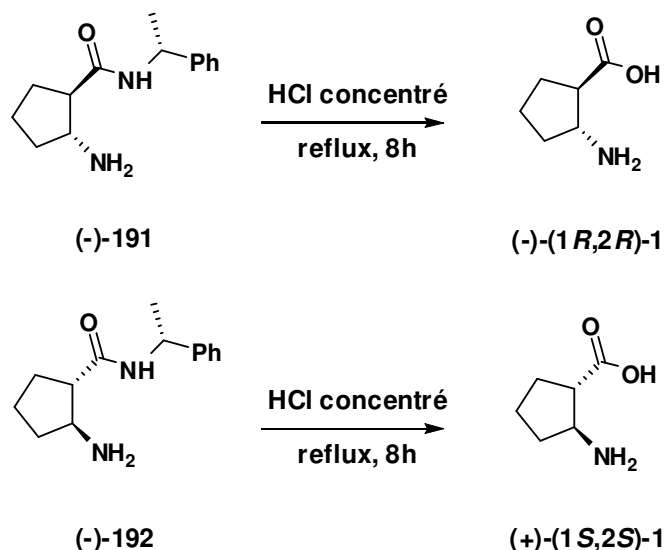


Schéma 69

Notre objectif était d'hydrolyser l'amide secondaire pour retomber sur l'acide carboxylique. Le composé **149** possédant un groupement Boc très sensible aux conditions acides, la méthode nous permettrait de réaliser une déprotection, puis, une hydrolyse en une seule étape. En contrepartie, il faudrait reprotéger l'amine puis l'acide afin de réaliser l'étape d'épimérisation du composé de configuration *cis*.

Nous avons donc évalué la réactivité de l'amide **(+)-187** en milieu acide concentré. A température ambiante et après 12 heures d'agitation, il n'y avait plus de produit de départ et nous avons isolé un nouveau produit. Après l'interprétation des spectres de RMN, nous avons identifié ce produit comme étant le chlorhydrate d'amide **193** (Schéma 70). Comme nous nous y attendions, le Boc a été éliminé en milieu acide mais l'amide n'a pas été hydrolysé. Nous avons tenté la réaction en portant le milieu à reflux pendant 2 heures. L'analyse de brut réactionnel a confirmé la disparition de **(+)-187** et la dégradation du milieu. Cette dégradation pourrait être imputée à l'instabilité du cyclobutane par effet push-pull lorsque l'amine est déprotégée.

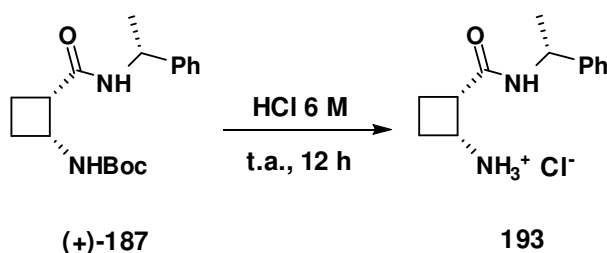


Schéma 70

ii) Hydrolyse en milieu basique

La littérature fait état de quelques exemples d'hydrolyse en milieu basique¹¹⁰. Généralement, ces réactions ont été réalisées dans des conditions drastiques, notamment avec un large excès d'hydroxyde de sodium dans l'éthylène glycol à reflux¹¹¹. Nous avons alors tenté d'hydrolyser l'amide **(+)-187** en milieu basique à reflux. Pour cela, nous avons mené une étude des conditions de réaction avec 10 équivalents des bases suivantes : LiOH, NaOH, Ba(OH)₂ et enfin le couple H₂O₂/LiOH. Pour chaque base, des essais ont été réalisés soit dans un mélange binaire THF/H₂O, soit 1,4-dioxane/H₂O. Enfin, nous avons observé l'évolution de chaque réaction à température ambiante, puis à reflux de solvant (Schéma 71). La conclusion de tous ces essais se résume en une stabilité exceptionnelle du composé **(+)-187** dans différents milieu basiques à température ambiante ou à reflux.

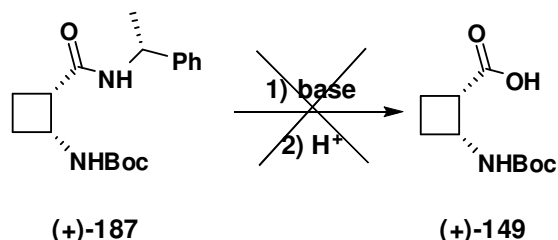


Schéma 71

iii) Hydrolyse de (±)-187 par le complexe chlorure de cuivre/glyoxale

Singh et Ran¹¹² ont décrit une méthode pour hydrolyser des amides secondaires en utilisant le complexe chlorure de cuivre/glyoxale. Cette méthode permet d'hydrolyser sélectivement les fonctions amides primaires et secondaires en présence d'une fonction ester, en général plus réactive.

¹¹⁰ Tanner, D. D. ; Osman, A. A. *J. Org. Chem.* **1987**, 52, 4689-4693

¹¹¹ Tsai, L. ; Newman, S. *J. Am. Chem. Soc.* **1957**, 79, 2530-2533

¹¹² Singh, L. ; Ram, N. *J. Org. Chem.* **1994**, 59, 710-711

Nous avons testé cette méthode pour hydrolyser l'amide secondaire **(+)-187**. Celui-ci a été introduit dans une solution aqueuse de glyoxale à 30 % en présence d'une quantité stœchiométrique de chlorure de cuivre. Le milieu a été ensuite porté à reflux pendant 30 minutes (Schéma 72). L'analyse du brut réactionnel a confirmé la disparition du produit de départ mais nous n'avons pas détecté la moindre trace d'acide carboxylique.

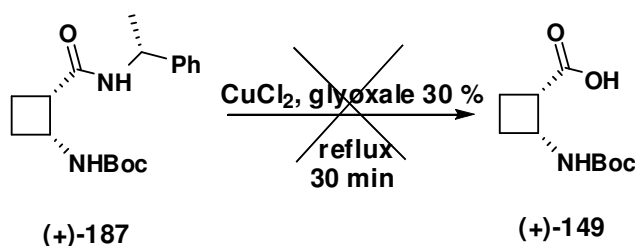


Schéma 72

iv) Hydrolyse enzymatique de (+)-187 et (+)-188

On trouve dans la littérature des méthodes d'hydrolyse de fonctions amides par l'action d'enzymes hydrolytiques comme les protéases, les acylases, etc...¹¹³ Cependant, ces méthodes sont utilisées pour réaliser le dédoublement d'un mélange racémique, c'est-à-dire que l'enzyme utilisée accepte l'un des deux énantiomères préférentiellement comme substrat.

Dans notre cas, nous voulions que les composés **(+)-187** et **(+)-188** soient substrats d'enzymes hydrolytiques (Schéma 73). De cette manière, chaque diastéréoisomère aurait été mis en réaction avec une hydrolase qui catalyserait la conversion de la fonction amide en acide carboxylique, pour obtenir les composés **(+)-149** et **(-)-149** énantiomériquement purs.

Nous avons réalisé plusieurs essais avec deux enzymes :

1) la pénicilline acylase utilisée pour le dédoublement d' α -méthylbenzylamides diastéréoisomères¹¹⁴.

2) la papaïne qui est une enzyme acceptant une large gamme de substrat¹¹³.

Les essais que nous avons menés avec ces deux enzymes ont été réalisés avec une concentration du substrat, un volume de tampon phosphate/co-solvant (9:1, v/v) et un pH

¹¹³ Drauz, K. ; Waldmann, H. *Enzyme catalysis in Organic Synthesis*, **2002**, Vol 2, Wiley-VCH, 716-740

¹¹⁴ Guranda, D. T. ; Khimiuk, A. I. ; Van Langen, L. M. ; Van Rankwijk, F. ; Sheldon, R. A. ; Svedas, V. K. *Tetrahedron Asymmetry*, **2004**, 15, 2901-2906

fixes. Les co-solvants que nous avons utilisés dans cette étude enzymatique étaient le DMF, le DMSO, le 1,4-dioxane et l'éthanol.

Nous avons donc testé l'activité de la pénicilline acylase et de la papaïne sur un mélange des diastéréoisomères **(+)-187** et **(+)-188**.

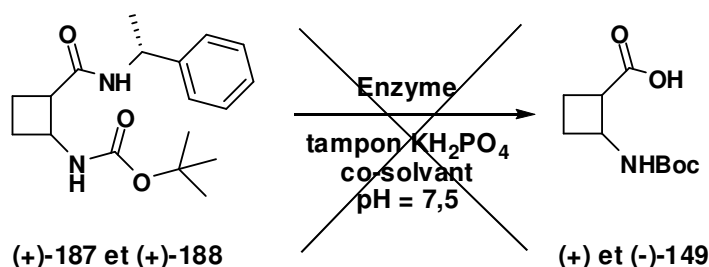


Schéma 73

Après 24 heures de réaction pour chaque essai avec l'une ou l'autre des deux enzymes, il n'y a eu aucune activité hydrolytique pour le mélange diastéréoisomérique **(+)-187** et **(+)-188**, récupérés quantitativement.

v) Bilan des études d'hydrolyse des amides diastéréoisomères

Les études d'hydrolyse du composé **(+)-187** ont révélé une réactivité très particulière. Tout d'abord, nous avons voulu accéder directement à l'acide aminé **(+)-105** par l'hydrolyse et la déprotection simultanées de **(+)-187** en milieu acide concentré. Nous avons alors observé la sensibilité du cyclobutane qui dès que l'amine est déprotégée, subirait une ouverture.

Par contre, l'hydrolyse en milieu basique n'a rien donné et le composé **(+)-187** a été récupéré en totalité.

Nous avons tenté l'hydrolyse du mélange diastéréoisomérique **(+)-187** et **(+)-188** via la catalyse enzymatique. Malheureusement, les deux hydrolases que nous avons choisies n'ont pas permis d'obtenir les acides carboxyliques correspondants.

Il était nécessaire de trouver une voie alternative pour arriver aux acides aminés **(+)-105** et **(-)-105** à partir des amides diastéréoisomères.

b) Débenzylation des amides diastéréoisomères

Malgré les tentatives pour hydrolyser l'amide **(+)-187** en milieu acide, basique ou par l'utilisation de la chimie enzymatique, nous nous sommes à chaque fois heurtés à un problème soit de dégradation, soit d'inertie du produit de départ.

Nous devons faire face à deux problèmes récurrents :

- la fragilité du cyclobutane en milieu acide
- la difficulté à hydrolyser des amides secondaires et encore plus avec le motif α -méthylbenzylamide.

Une possibilité de contourner ce problème d'hydrolyse consiste à partir d'un amide plus réactif que l' α -méthylbenzylamide. La nature benzylique "fortuite" de l' α -méthylbenzylamide qui nous a permis d'obtenir le dédoublement, pourrait être utilisée également pour accéder à l'amide primaire **194** (Schéma 74).

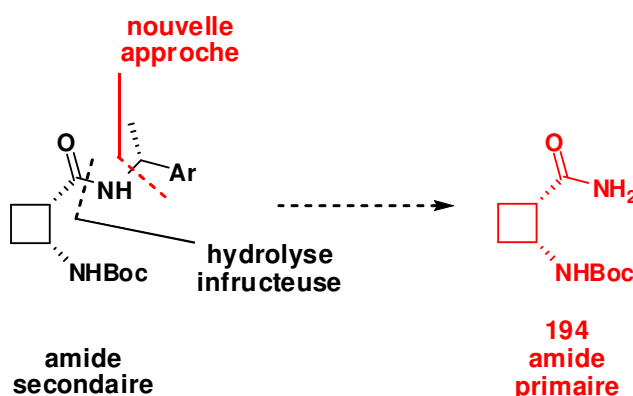


Schéma 74

Sachant que les amides primaires sont plus facilement hydrolysés que les amides secondaires, nous aurions la possibilité d'arriver aux 4 stéréoisomères de l'ACBC.

La stratégie que nous avons mis au point passe par la débenzylation des amides **(+)-187**, **(+)-188**, **(-)-189** et **(-)-190** pour donner les amides primaires **(+)-194** et **(-)-194** optiquement purs. A partir de celui-ci, nous avons envisagé deux types d'interconversion du carboxamide primaire :

- L'hydrolyse de **194** qui conduirait au carbamate-acide **149**,
- La méthanolyse de **194** pour former le carbamate-ester **147**, et ainsi étudier directement son épimérisation (Schéma 75).

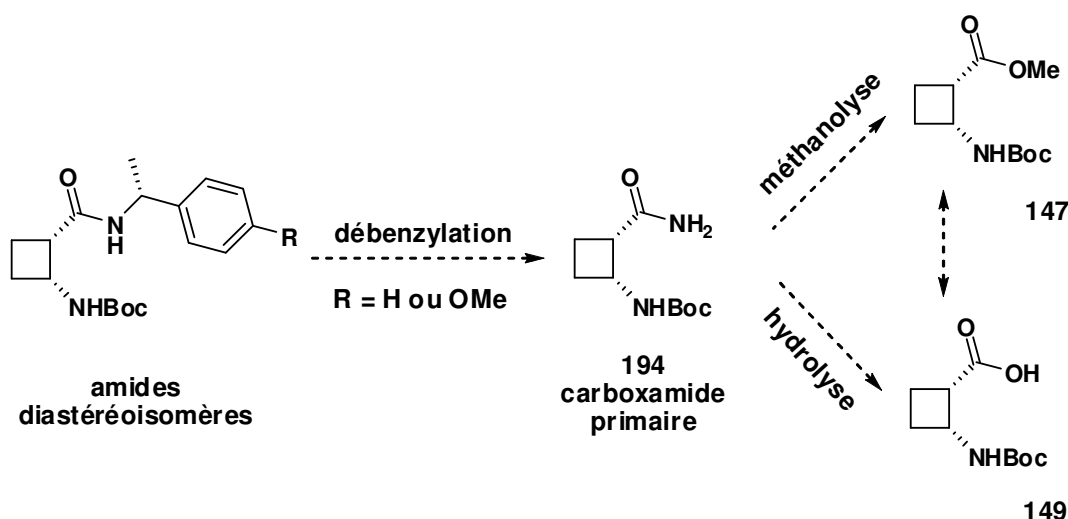


Schéma 75

Nous détaillerons par la suite les différentes méthodes testées pour la débenzylation des composés **(+)-187**, **(+)-188**, ainsi que les amides **(-)-189** et **(-)-190**. Comme précédemment, nous avons travaillé uniquement sur le composé **(+)-187** par soucis de clarté et de linéarité dans l'interprétation des résultats. Par conséquent, si une méthode s'avérait être convenable pour le composé **(+)-187**, les 3 autres composés seraient alors également testés.

i) Débenzylation de (+)-187 en milieu acide

Dans la littérature, on trouve quelques exemples de débenzylation de motifs *N*-méthylbenzylamides en présence d'acide formique¹¹⁵. Nous avons déjà remarqué l'instabilité du cyclobutane en milieu acide concentré et à reflux. Même si nous aurions préféré un protocole de débenzylation qui permette de conserver le groupement Boc, nous avons voulu vérifier que la débenzylation en milieu acide de **(+)-187** était plausible. Nous avons donc suivi le protocole décrit par Jouillé *et al.*¹¹⁶, où nous avons placé **(+)-187** dans l'acide formique à 50 °C. Après 2 heures de réaction, la totalité de **(+)-187** a été consommée. Nous avons obtenu une réaction sale avec un composé majoritaire, identifié par RMN, comme étant le formiate d'ammonium de l'amide **195** (Schéma 76).

¹¹⁵ Magnus, N. A. ; Confalone, P. N. ; Storace, L. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 4, 3015-3019, Agami, C. ; Dechoux, L. ; Melaimi, M. ; *Tetrahedron Lett.* **2001**, 42, 8629-8631

¹¹⁶ a) Jouillé, M. M. ; Wang, P. C. ; Semple, J. E. *J. Am. Chem. Soc.* **1980**, 887-889, b) Davies, S. G. ; Fenwick, D. R. ; Ichihara, O. *Tetrahedron Asymmetry* **1997**, 8, 3387-3391

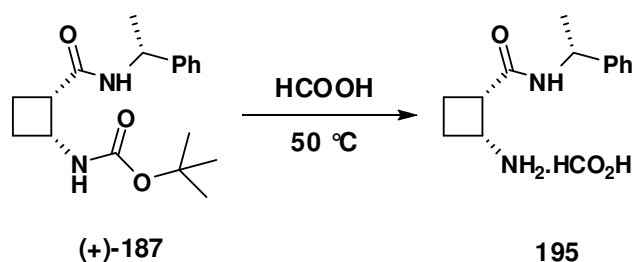


Schéma 76

Ensuite, nous avons soumis **(+)-187** à un traitement avec un équivalent d'acide mésylique dans le toluène anhydride et à reflux pendant une heure¹¹⁷. Le composé **(+)-187** a été totalement transformé en un produit fluorescent. Après purification, l'analyse par RMN de ce composé nous a montré qu'il s'agissait du δ -lactame **197** obtenu à hauteur de 62 % (Schéma 73).

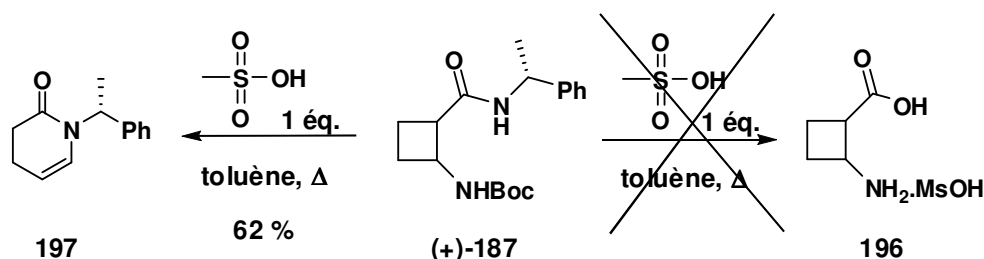
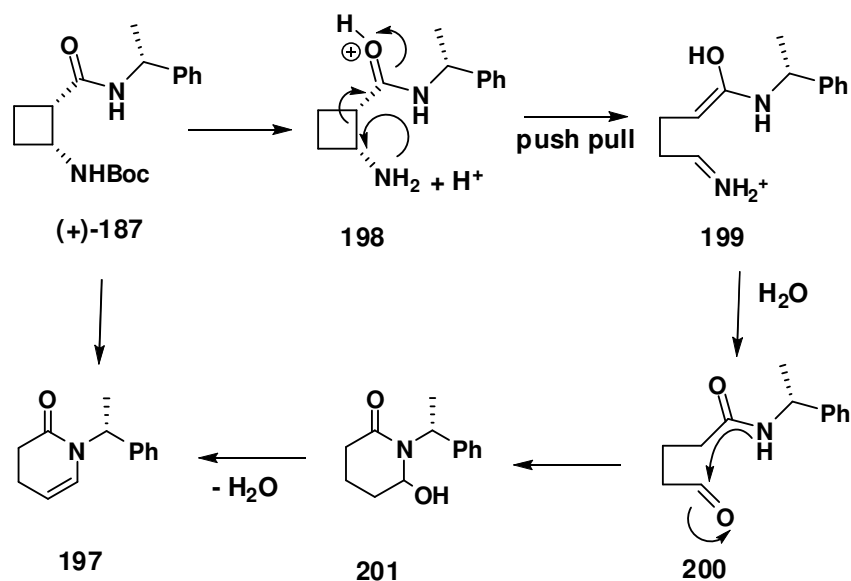


Schéma 73

Nous proposons le mécanisme suivant pour expliquer la formation du produit de cyclisation **197** (Schéma 78). La fonction Boc de **(+)-187** a été éliminée par le traitement acide pour former le sel d'ammonium **198** en équilibre avec l'amine non-protonée. Le cyclobutane est ouvert par un mécanisme "push-pull" irréversible pour conduire à l'iminium **199**. En présence d'une quantité infinitésimale et catalytique d'eau, le composé **199** va conduire à la formation de l'aldéhyde **200**. Puis, une attaque nucléophile intramoléculaire de l'azote sur l'aldéhyde va former le δ -lactame **201**. Par déshydratation, il s'est formé le composé final **197**.

L'acide mésylique commercial que nous avons utilisé, était pur à 99 %. Cependant, une seule molécule d'eau était suffisante pour réaliser le passage de l'iminium à l'aldéhyde et finir avec le δ -lactame **197**.

¹¹⁷ Paik, S. ; Lee, J. Y. *Tetrahedron Lett.* **2006**, 47, 1813-1815



Face aux problèmes de compatibilité du groupement Boc avec une débenzylation acide, nous avons abandonné cette approche.

ii) Débenzylation de (+)-187 et (+)-188 avec le sodium dans l'ammoniac

Dans la littérature, il a été décrit la débenzylation d'amides secondaires de type α -méthylbenzylamide par un métal alcalin dans l'ammoniac liquide. Ce type de réaction a conduit aux amides primaires correspondant avec d'excellents rendements¹¹⁸. Selon le protocole décrit par Juaristi *et coll.*¹¹⁹, nous avons donc entrepris de débenzyler le composé **(+)-187** en le plaçant dans une solution d'ammoniac et de THF à $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, et en présence de 7 équivalents de sodium métallique (Schéma 75). Après 2 heures d'agitation, **(+)-187** a été totalement consommé et un nouveau produit plus polaire apparaît. Après purification du brut réactionnel par chromatographie, nous avons isolé un solide blanc. La caractérisation par RMN a permis d'établir qu'il s'agissait de l'amide primaire **(+)-194**, isolé avec un rendement de 80 % (Schéma 79). Au vue de ces résultats encourageants, nous avons engagé l'amide **(+)-188** dans les conditions réactionnelles utilisées précédemment, et avons ainsi récupéré l'amide **(-)-194** avec un rendement de 85 % (Schéma 75).

La mesure de l'activité optique de **(+)-194** et **(-)-194** nous a donné des pouvoirs rotatoires opposés (+133 et -133 respectivement).

¹¹⁸ a) Okamoto, S. ; Fukuhara, K. ; Sato, F. *Tetrahedron Lett.* **2000**, 41, 6651-5565, b) Puyn, D. K. ; Lee C. H. ; Ha, H. J. ; Park, C. S. ; Chang, J-W. ; Lee, W. K. *Org. Lett.* **2001**, 3, 4197-4199

¹¹⁹ Anaya de Parrodi, C. ; Juaristi, E. ; Quintero, L. ; Clara-Sosa, A. *Tetrahedron Asymmetry*, **1997**, 8, 1075-1082

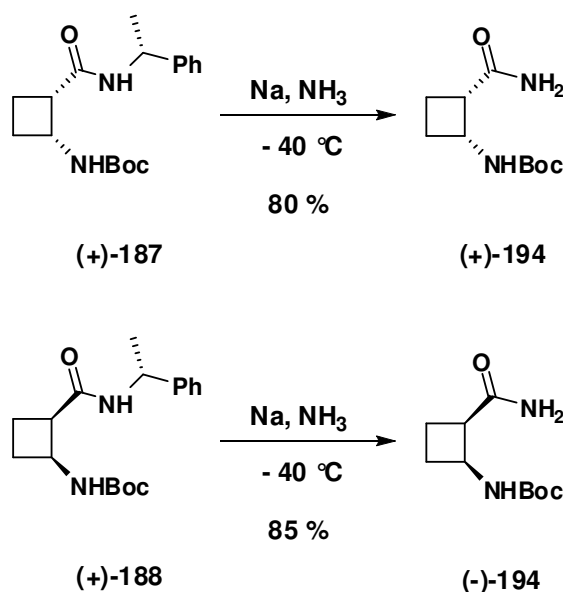


Schéma 79

iii) Débenzylation de (–)-189 et (–)-190 avec des oxydants

Parce qu'ils sont synthétisés avec un bon rendement et aisément séparables, les composés (–)-189 et (–)-190 constituent des intermédiaires plausibles pour obtenir les énantiomères de l'acide aminé recherché. La présence d'un groupe *para*-méthoxy ouvre une voie alternative pour la débenzylation¹²⁰. Nous avons mené une étude de débenzylation de (–)-189 avec le CAN¹²¹ (oxydant minéral) et le DDQ¹²² (oxydant organique).

Le composé (–)-189 a été mis en réaction dans le dichlorométhane en présence d'un équivalent de DDQ. Après 24 heures d'agitation à température ambiante, le système n'avait pas évolué et nous avons pu récupérer le produit de départ.

Ensuite, nous avons mis (–)-189 dans une solution d'acétonitrile/eau (1:1, v/v) en présence de 7 équivalents de CAN. Après 1 heure d'agitation, le produit de départ avait été consommé et deux nouveaux produits étaient apparus. Après isolement de chacun d'eux par chromatographie et interprétation des spectres RMN, nous avons constaté qu'il s'agissait des produits de coupure de l' α -méthylbenzylamide, à savoir l'amide primaire (+)-194 et la *para*-méthoxyacétophénone. Ainsi, par cette méthode de débenzylation, nous avons pu isoler le composé (+)-194 avec un rendement de 65 % (Schéma 80). De suite, nous avons

¹²⁰ a) Yoshimura, J. ; Yamaura, M. ; Suzuki, T. ; Hashimoto, H. *Chem. Lett.* **1983**, 1001-1005, b) Rigby, J. H. ; Mateo, M. E. ; *J. Am. Chem. Soc.* **1997**, *119*, 12665-12669, c) Wood, J. L. ; Stoltz, B. M. ; Dietrich, H.-J. *J. Am. Chem. Soc.* **1996**, *118*, 10656-10662

¹²¹ Yamaura, M. ; Suzuki, T. ; Hashimoto, H. ; Yoshimura, J. ; Okamoto, T. ; Shin, C.-G. *J. Bull. Chem. Soc. Jpn.* **1985**, *58*, 1413-1415

¹²² Chern, C.-Y. ; Huang, T.-P. ; Kann, W. K. *Tetrahedron Lett.* **2003**, *44*, 1039-1041

placé l'amide **(-)-190** dans les mêmes conditions réactionnelles pour aboutir à un résultat similaire, c'est-à-dire l'obtention de **(-)-194** avec un rendement de 40 %.

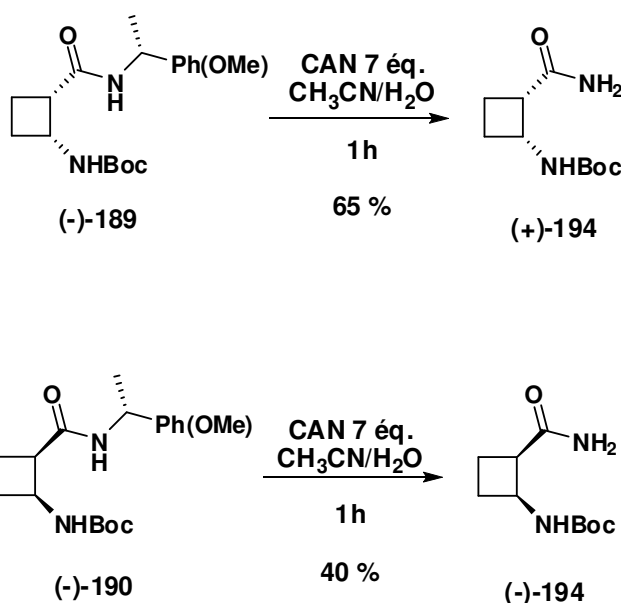


Schéma 80

Nous avons également mesuré l'activité optique de **(+)-194** et **(-)-194** obtenus par la débenzylation de **(-)-189** et **(-)-190** en présence de CAN. Là encore, nous avons observé des pouvoirs rotatoires opposés (+133 et -133 respectivement).

La débenzylation de **(-)-189** et **(-)-190** avec le CAN constitue une méthode pour accéder aux énantiomères **(+)-194** et **(-)-194** optiquement enrichis. Le rendement modeste pourrait s'expliquer par la présence d'acide nitrique généré dans le milieu, lequel entraînerait l'élimination du Boc favorisant ainsi l'ouverture du cycle.

iv) Bilan sur les débenzylation

Nous avons testé deux stratégies de débenzylation des amides diastéréoisomères **(+)-187** et **(+)-188**, ainsi que des amides **(-)-189** et **(-)-190**. La première stratégie était basée sur une hydrolyse acide, et nous avons utilisé le composé **(+)-187** pour mener cette étude. Finalement, nous avons tirés les mêmes conclusions que celles décrites dans la section précédente sur l'hydrolyse des α -méthylbenzylamides diastéréoisomères, à savoir qu'il était difficile de gérer la stabilité du cyclobutane lorsque l'amine est déprotégée en condition acide.

Dans la seconde stratégie, nous voulions débenzyler la fonction α -méthylbenzylamide dans un milieu non-acide. Nous avons donc utilisé une méthode pour débenzyler **(+)-187** et **(+)-188** en présence de sodium dans l'ammoniac, et nous avons pu ainsi isoler les énantiomères **(+)-194** et **(-)-194** optiquement enrichis avec de bons rendements. Ces derniers ont également été isolés par traitement de **(-)-189** et **(-)-190** avec le CAN, mais avec un rendement un peu plus modeste.

En résumé, nous avons mis au point deux méthodes d'accès aux énantiomères **(+)-194** et **(-)-194** à partir de 2 paires d'amides diastéréoisomères différents.

4) Transformations clés de l'amide 194

A ce stade de notre travail, notre intention était d'effectuer la méthanolyse ou bien l'hydrolyse, puis l'estérification de **194**, afin d'obtenir l'ester **147**, dont les énantiomères ont déjà été décrits dans la 1^{ère} méthode. Le second objectif de ce travail était d'améliorer le rendement d'épimérisation de **147** pour fournir de manière conséquente l'isomère **150** (Schéma 81).

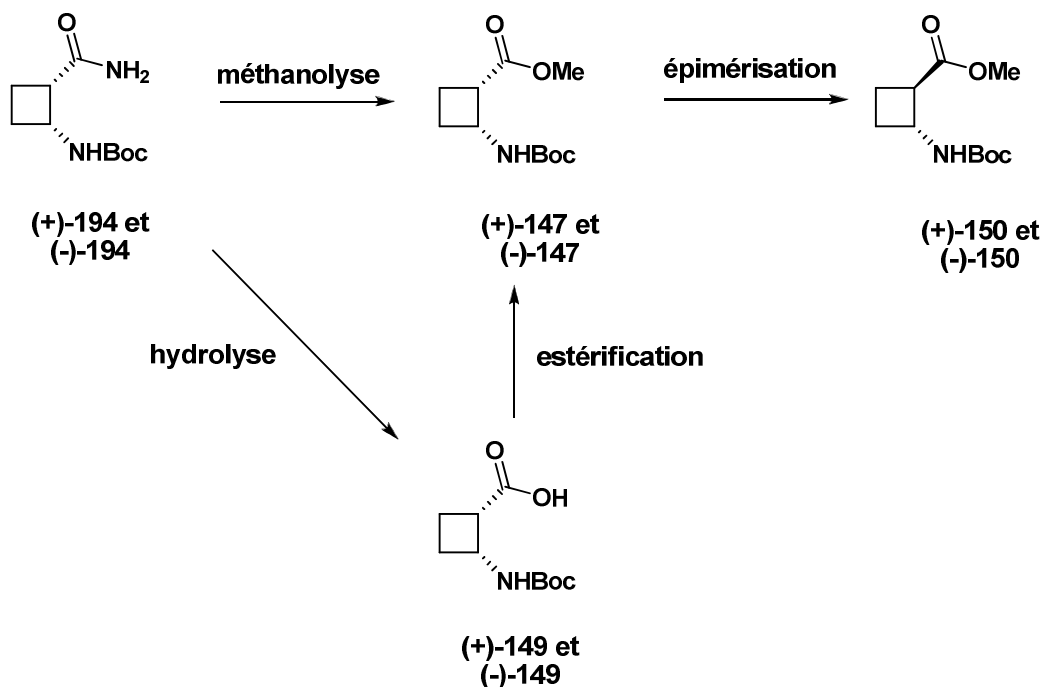


Schéma 81

Nous avons décidé de mettre au point les protocoles adaptés en travaillant avec le racémique **(±)-194** pour ne pas épuiser le stock d'échantillons énantiomériquement purs.

Une fois identifiés, ces protocoles seraient appliquées aux composés **(+)-194** et **(-)-194** issus de la section précédente. Cela nécessitait la préparation préalable du racémique **(±)-194**.

a) Préparation de l'amide (±)-194

Dans la littérature, on trouve de nombreuses méthodes pour transformer un acide carboxylique en amide primaire^{123,124}. Nous avons choisi une méthode d'amidation décrite par Talukdar *et al.* utilisant le formiate d'ammonium pour générer *in situ* de l'ammoniac¹²⁵ (Schéma 82). Ainsi, l'acide **(±)-149** décrit dans la 1^{ère} méthode, a été mis en réaction dans le 1,4-dioxane en présence de Boc_2O et de formiate d'ammonium. Après 4 heures d'agitation à température ambiante, nous avons pu obtenir le racémique **(±)-194** avec un rendement de 95 %.

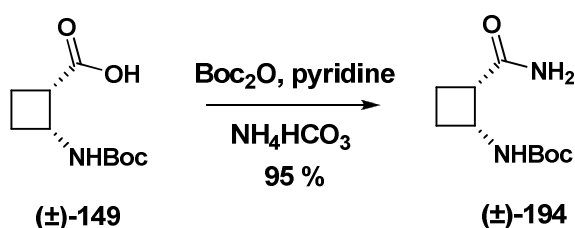


Schéma 82

Grâce à cette synthèse, nous avons ainsi pu préparer des quantités suffisantes d'amide **(±)-194** afin d'étudier sa conversion en acide carboxylique ou en ester.

b) Méthanolyse de (±)-194

Nous avons testé une méthode de méthanolyse de **(±)-194** dans des conditions de réaction douce. Cette méthode utilise l'acétal du diméthylformamide (DMF-DMA) dans le méthanol et à température ambiante¹²⁶ (Schéma 83).

Le composé **(±)-194** a été mis en réaction avec trois équivalents de DMF-DMA dans le méthanol et la solution a été agitée pendant une nuit à température ambiante. Après

¹²³ a) Catalano, J. G. ; Deaton, D. N. ; Long, S. T. ; Robert, McFadyen, R. B. ; Miller, L. R. ; Payne, J. A. ; Wells-Knecht, K. J. ; Wright, L. L. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **2004**, 14, 719–722, b) Cardillo, G. ; Gentilucci, L. ; Qasem, A. R. ; Sgarzi, F. ; Spampinato, S. *J. Med. Chem.* **2002**, 45, 2571–2578

¹²⁴ Chulin, A. N. ; Rodionov, I. L. ; Baidakova, L. K. ; Rodionova, L. N. ; Balashova, T. A. ; Ivanov, V. T. *J. Pept. Sci.* **2005**, 175–186

¹²⁵ Talukdar, P. ; Bollot, G. ; Mareda, J. ; Sakai, N. ; Matile, S. *Chem. Eur. J.* **2005**, 11, 6525–6532

¹²⁶ Anelli, P. L. ; Brocchetta, M. ; Palano, D. ; Visigalli, M. *Tetrahedron Lett.* **1997**, 38, 2367–2368

purification par chromatographie, nous avons obtenu un mélange de deux composés dans un rapport de 2:1 et un rendement global de 95 %. Le premier composé était le *cis*-ester (**±**)-**147** attendu. De façon surprenante, le deuxième composé était le *trans*-ester (**±**)-**150**, et ces composés étaient identiques à ceux préparés par la 1^{ère} méthode.

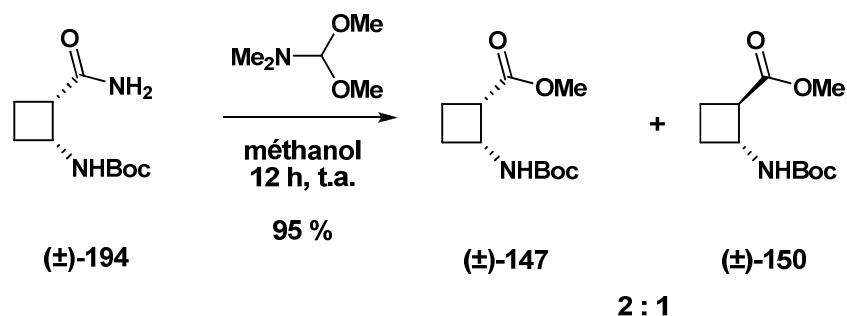


Schéma 83

Afin de mieux comprendre l'origine de la formation du *trans*-ester (**±**)-**150**, nous avons mené une étude sur l'évolution de la réaction par analyse GC-MS. Le tableau 9 ci-dessous détaille les proportions de chaque isomère en fonction de la durée de réaction et du chauffage.

Progrès de la réaction Temps (h) (temp.)	Proportion des produits dans le milieu réactionnel		
	(±)- 194 ^a	(±)- 147 ^a	(±)- 150 ^a
1 (t.a.)	85	15	0
2 (t.a.)	68	32	0
3 (t.a.)	50	33	17
4 (t.a.)	35	51	14
5 (t.a.)	0	64	36
13 (t.a.)	0	66	33
13 (t.a.) + 1 (reflux)	0	49	51
13 (t.a.) + 6 (reflux)	0	19	81
13 (t.a.) + 10 (reflux)	0	5	95

a : rapport déterminé par GC-MS

Tableau 9

Au bout de 23 heures de réaction, dont 10 heures de chauffage à reflux, le milieu réactionnel a été traité. Après purification par chromatographie, le *trans*-ester (**±**)-**150** a été isolé pur avec un rendement de 91 %.

Après analyse de la cinétique de formation et de disparition des différents composés, nous pouvons voir que le composé **(±)-147** apparaît au bout d'une heure de réaction, alors que le composé **(±)-150** n'apparaît qu'après 3 heures. Afin de vérifier si l'épimérisation avait lieu sur l'ester **(±)-147** nouvellement formé par action de DMF-DMA, nous les avons mis en réaction pendant 12 heures. Après traitement du milieu réactionnel, nous avons récupéré le composé **(±)-147** quantitativement (Schéma 84). Nous pouvons dire que l'épimérisation n'a pas lieu *via* le *cis*-ester **(±)-147**.

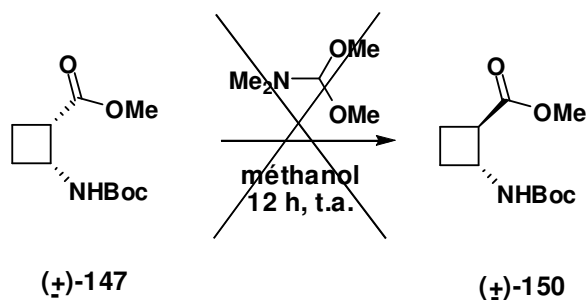


Schéma 84

Ces informations nous ont indiqué que l'épimérisation avait lieu une fois que la méthanolyse était bien avancée. Cela suggère que le *N,N*-diméthylimidate **202**, produit de réaction entre l'amide et le DMF-DMA agirait comme base pour démarrer la réaction d'épimérisation (Schéma 85). Nous proposons le mécanisme suivant :

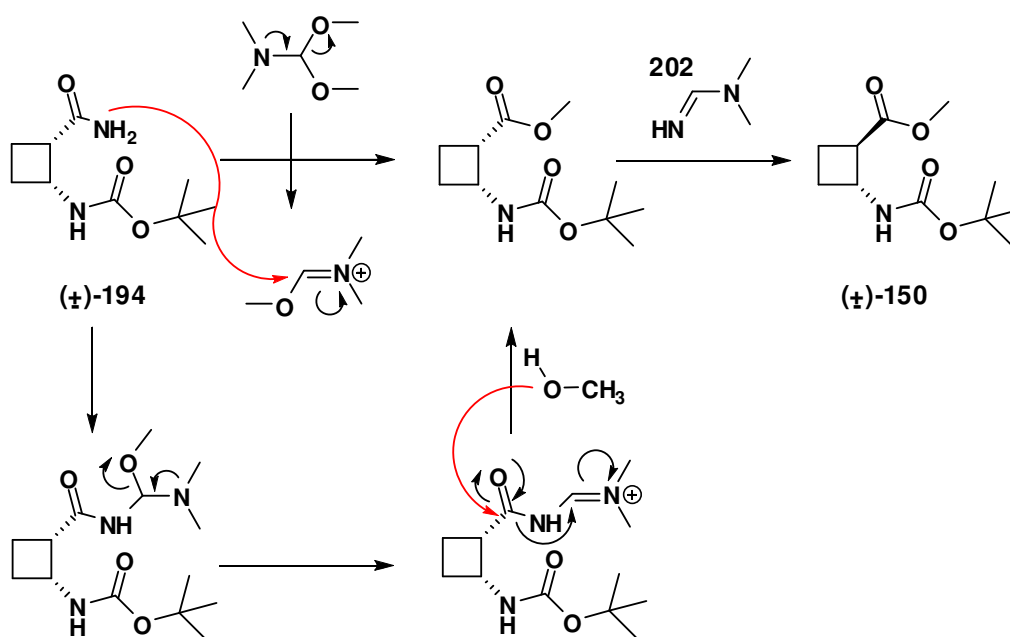


Schéma 85

Bien qu'inattendue, cette réaction tandem pourrait s'avérer fort intéressante. En effet, nous pourrions l'utiliser pour accéder aux énantiomères du *trans*-ACBC.

c) Hydrolyse de (±)-194

Compte tenu de l'importance de l'hydrolyse du carboxamide (±)-194, et se rappelant des difficultés rencontrées dans la section précédente concernant la transformation des α -méthylbenzylamides, nous avons examiné une grande variété d'hydrolyse de l'amide (±)-194. Ces méthodes peuvent être classées en 4 groupes : les hydrolyses neutres, les hydrolyses en milieu acide, les hydrolyses de *N*-Boc-carboxamides, et les hydrolyses en milieu basique.

i) Hydrolyse en milieu acide

Au vu des résultats d'hydrolyses effectuées sur l'amide (±)-187 (cf. section 3.a, p.90), l'utilisation d'un tel milieu n'était pas, à priori, de premier intérêt pour nos objectifs. Rappelons que nous cherchons un accès à l'ester 147 pour optimiser l'étape d'épimérisation (cf. schéma 81). Toutefois, même si l'élimination du Boc paraissait inéluctable, nous avons examiné la réactivité de (±)-194 en milieu acide (Schéma 86). Les résultats sont présentés dans le tableau 10.

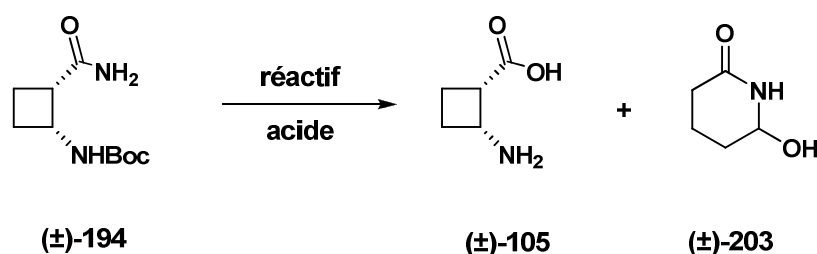


Schéma 86

Entrée	Réactifs (éq.)	Temps (h)	Temperature (°C)	Rdt de 105 (%)	Rdt de 203 (%)
1	HCl 11,6 M	2	t.a.	0	- ^a
2	H ₂ SO ₄ 75 %, NaNO ₂ (1)	3	t.a.	0	- ^a
3	HCl 3,5 M, NaNO ₂ (1)	4	t.a.	41	23
4	HCl 3,5 M, NaNO ₂ (1)	18	t.a.	57	9
5	NOHSO ₄ /H ₂ SO ₄	3	t.a.	66	0
6	NOHSO ₄ /H ₂ SO ₄	2	t.a.	88	0

Tableau 10

a : Produit majoritaire non quantifiable

Tout d'abord, nous avons traité l'amide **(±)-194** avec l'acide chlorhydrique concentré (entrée 1). Au bout de 2 heures d'agitation, nous avons observé la formation de plusieurs produits dont un majoritaire, pour lequel l'analyse par RMN nous a permis de proposer la structure du δ -lactame **(±)-203**. Nous avons déjà observé la formation d'un δ -lactame dans l'hydrolyse acide de **(±)-187** (Section 2.b, p.97) et la formation de **(±)-203** ici peut s'expliquer de la même façon : après déprotection du Boc en milieu acide, il y a ouverture du cyclobutane par effet push-pull, puis, formation de l'aldéhyde correspondant qui subit une attaque intramoléculaire de l'amide (Schéma 87).

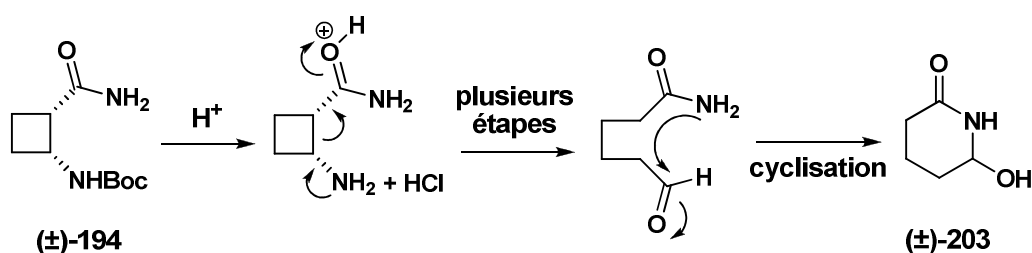


Schéma 87

Notre intérêt s'est ensuite tourné vers l'hydrolyse du carboxamide de **(±)-194** via un intermédiaire diazonium, un protocole qui se déroule en milieu acide. Rappelons que nous avons utilisé cette approche pour la déprotection de l'urée **(±)-128** dans la dernière étape de la synthèse du *cis*-aminoacide **(±)-105** (Section 2.a, p. 65). Nous avons traité l'amide **(±)-194** avec du nitrite de sodium dans l'acide sulfurique à 75 % (entrée 2)¹²⁷, et au bout de 3 heures de réaction, le composé majoritaire était le δ -lactame **(±)-203**.

Nous avons répété cette réaction dans l'acide chlorhydrique 3.5 M. Lorsque l'addition de nitrite de sodium a été faite 1 heure après dissolution de l'amide **(±)-194** (entrée 3), il s'est formé l'aminoacide **(±)-105** cherché mais accompagné par le δ -lactame **(±)-203** (rendements respectifs de 41 et 23 %). Lorsque l'addition du nitrite de sodium a été effectuée directement après dissolution totale de l'amide (entrée 4), c'est-à-dire après 15 minutes, le rendement de l'aminoacide **(±)-105** s'est accru aux dépens du δ -lactame **(±)-203** (57 % et 9 % respectivement).

Enfin, nous avons encore amélioré la transformation en **(±)-105** en utilisant l'acide nitrososulfurique à 40 % (NOHSO_4) dans l'acide sulfurique¹²⁸. Avec un temps de réaction de

¹²⁷ Steinmetz, M. G. ; Mayes, R. T. *J. Am. Chem. Soc.* **1985**, *107*, 2111-2121

¹²⁸ Wade, L. G. ; Silvey, W. B. *O.P.P.I.*, **1981**, 357-359

3 heures à température ambiante, nous avons isolé le composé **(±)-105** avec un rendement de 66 % (entrée 5). Avec un temps de réaction réduit (entrée 6), le rendement a atteint 88 %.

Même si l'hydrolyse de **(±)-194** en milieu acide n'est pas, a priori, utile pour l'accès à un dérivé du *trans*-ACBC, nous avons établi une double déprotection "one pot" efficace en *cis*-aminoacide **(±)-105**.

ii) Hydrolyse neutre

Dans la littérature, on trouve quelques méthodes qui permettent d'hydrolyser des amides primaires en milieu neutre. Nous avons retenu trois protocoles pour tenter d'hydrolyser le carboxamide **(±)-194** (Schéma 88).

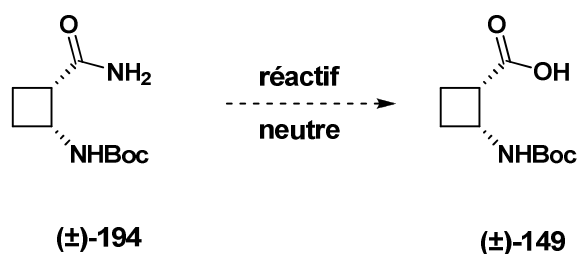


Schéma 88

Le premier a été décrit par Olah et Olah¹²⁹. L'amide **(±)-194** a ainsi été traité avec 1,2 équivalents de tétrafluoroborate de nitrosyle (NOBF₄) dans l'acétonitrile et à 50 °C. Après 4 heures d'agitation, nous avons observé une dégradation complète du produit de départ.

Nous avons ensuite essayé d'hydrolyser l'amide **(±)-194** en le traitant avec 1 équivalent d'anhydride tétrafluorophtalique, sans solvant, à haute pression et haute température¹³⁰. Après 24 heures à 175 °C, nous n'avons pas observé la présence de l'acide **(±)-149**, et l'amide de départ a pu être récupéré à la fin de la réaction.

En dernier lieu, nous avons fait usage des micro-ondes selon la méthode développée par Heravi *et al.*¹³¹ L'amide **(±)-194** a été mélangé avec 1 équivalent d'anhydride phtalique dans du silica gel, et le milieu réactionnel a été irradié à 185 °C pendant 55 minutes. Cependant, même avec une durée d'irradiation longue, l'acide **(±)-149** n'a pas été détecté et l'amide a pu être récupéré à la fin de la réaction.

¹²⁹ Olah G. A. ; Olah, J. A. *J. Org. Chem.* **1965**, *30*, 2386-2387

¹³⁰ Eaton, J. T. ; Rounds, W. D. ; Gribble, G. W. *Tetrahedron Lett.* **1988**, *29*, 6553-6555

¹³¹ Heravi, M. M. ; Zargarani, D. ; Shoar, H. R. ; Khaleghi, S. *J. Chem. Res.* **2005**, 119-120

iii) Hydrolyse en milieu basique

Nous avons déjà vu que l'hydrolyse de l' α -méthylbenzylamide **(+)-187** en milieu basique, avec différentes bases minérales et différents solvants, s'était soldé par un échec et nous avons aussi noté une stabilité de ce composé dans des conditions basiques extrêmes (*cf.* section 3.a.ii, p.92).

Ici, nous pouvions nous attendre à une réactivité toute autre puisque le carboxamide primaire **(\pm)-194** est plus sensible à l'hydrolyse.

Parmi les méthodes d'hydrolyse d'amides primaires décrites dans la littérature^{132,133}, nous avons choisi d'utiliser le protocole proposé par Zha *et al.*¹³⁴ Ainsi, l'amide **(\pm)-194** a été dissous dans une solution de soude à 25 % dans le méthanol, et le milieu a été porté à reflux pendant 12 heures. Après traitement de la réaction, nous avons isolé un nouveau produit. L'analyse des spectres de RMN de ce composé nous a permis de l'identifier comme étant le *trans*-acide **(\pm)-151** obtenu avec un rendement quantitatif (Schéma 89).

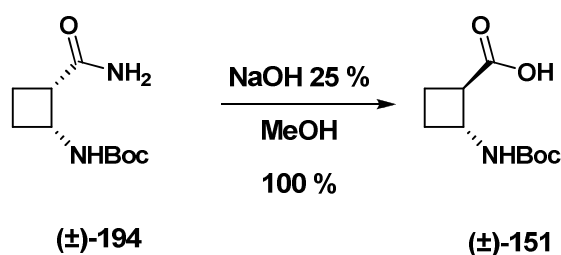


Schéma 89

Nous avons donc découvert une méthode d'accès direct au *trans*-acide **(\pm)-151** à partir de l'amide **(\pm)-194**, en réalisant à la fois une épimérisation et une hydrolyse.

Surpris de la réactivité de l'amide **(\pm)-194** dans ces conditions, il paraissait nécessaire de savoir dans quel ordre pouvait intervenir l'hydrolyse et l'épimérisation. Tout d'abord, nous avons placé l'acide **(\pm)-149** dans les mêmes conditions de réaction. Le traitement de la réaction a permis d'isoler de nouveau le composé **(\pm)-149** quantitativement (Schéma 90).

¹³² Buckmelter, A. J. ; Rychnovsky, S. D. *J. Am. Chem. Soc.* **2000**, *122*, 9386-9390

¹³³ Vaughn, H. L. ; Robbins, M. D. *J. Org. Chem.* **1975**, *40*, 1187-1189

¹³⁴ Zha, C. ; Brown, G. B. ; Brouillette, W. J. *J. Med. Chem.* **2004**, *47*, 6519-6528

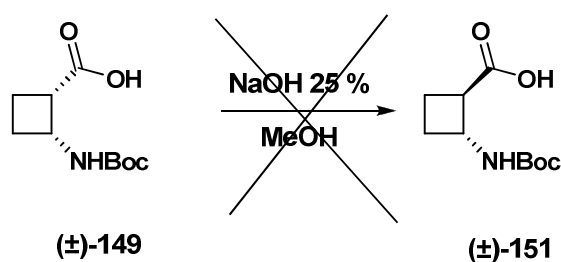


Schéma 90

Nous avons ensuite mené une étude sur la cinétique de transformation de l'amide (±)-194 en fonction de la concentration en base et du temps. Nous avons préparé trois échantillons de concentration croissante et nous les avons chauffés à reflux (Schéma 91). Les résultats sont présentés dans le tableau 11.

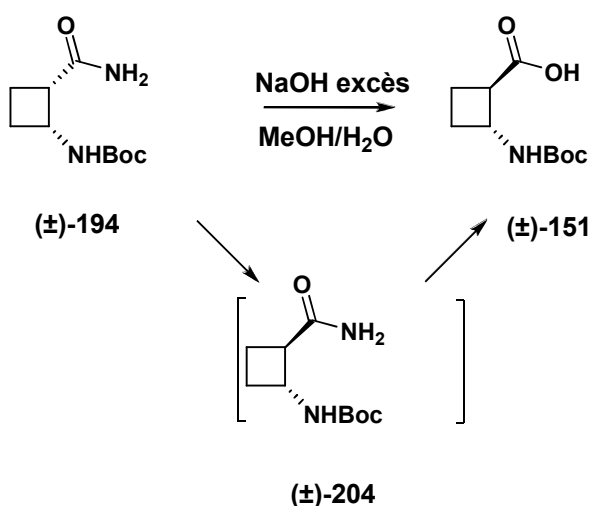


Schéma 91

Entrée	Solution de NaOH (éq. molaires)	t.a., 4 h	Reflux, 4 h	Reflux, 18 h
1	0,04 M (2 éq.)	(±)-194	(±)-194	(±)-204
2	0,2 M (10 éq.)	(±)-194	(±)-204	(±)-151
3	1,5 M (90 éq.)	(±)-194	(±)-151	(±)-151

Tableau 11

Lorsque la réaction s'est déroulée dans un milieu faiblement concentré en soude et après 18 heures de reflux, nous avons isolé l'amide (±)-204, épimère de l'amide (±)-194. L'augmentation de la concentration en soude n'a fait que croître la cinétique d'apparition de (±)-204 et après 18 heures de reflux, nous avons isolé l'acide (±)-151.

iv) Bilan des transformations de l'amide (±)-194 et accès au (±)-trans-ACBC

Notre première constatation a porté sur la réactivité du carboxamide primaire vs l' α -méthylbenzylamine. Ce dernier avait montré soit une stabilité de la fonction amide en milieu basique, soit une ouverture du cycle en milieu acide (section III.3, P. 90). A *contrario*, le carboxamide primaire a révélé une réactivité toute autre, conduisant à la formation des composés (±)-149, (±)-151 et (±)-105.

Nous avons vu que la formation du diazonium de l'amide (±)-194 dans un milieu acide concentré et à température ambiante, nous a conduit directement à l'acide (±)-105 avec un rendement maximum de 88 % (Schéma 93).

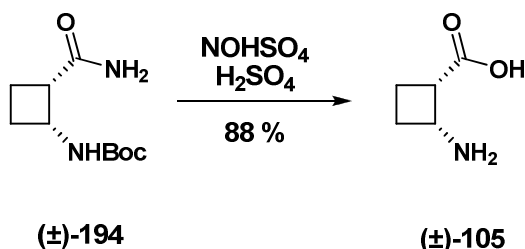


Schéma 93

En milieu basique, nous avons également obtenu la transformation de l'amide (±)-194 en acide (±)-151. Cette opération unique regroupe une épimérisation de l'amide pour fournir son isomère (±)-204, lequel a été de suite hydrolysé pour fournir l'acide désiré (Schéma 94). Cette opération semblait être excellente pour accéder rapidement au *trans*-ACBC à partir du *cis*-ACBC.

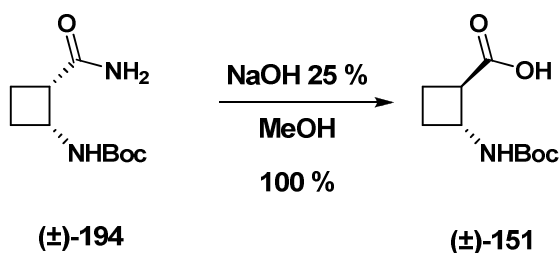


Schéma 94

Grâce à cette méthode d'épimérisation, nous avons synthétisé le *trans*-aminoacide (±)-110 à partir *cis*-aminoacide (±)-105, en 4 étapes et avec un rendement de 84 % (Schéma 95). Nous avons ainsi trouvé une méthode d'épimérisation qui répondait aux critères annoncés en début de ce chapitre.

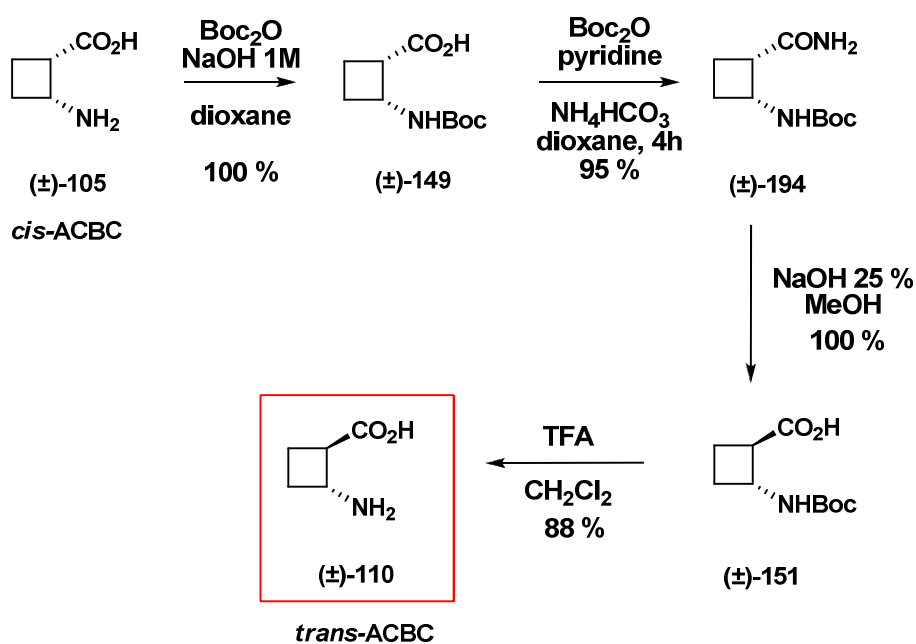


Schéma 95

En résumé de ce bilan, nous avons en main les deux méthodes d'hydrolyse (acide et basique) que nous allons appliquer à la synthèse énantio pure des 4 stéréoisomères de l'ACBC.

5) Application à la synthèse des β -aminoacides énantiomériquement purs

Ayant défini dans les sections précédentes, les conditions de dédoublement d'une part et les transformations permettant d'accéder aux *cis* et *trans* aminoacides d'autre part, nous avons combiné ces découvertes pour réaliser une nouvelle voie d'accès aux quatre stéréoisomères de l'ACBC énantiomériquement purs.

Chacun des amides **(+)-194** et **(-)-194** obtenu par les méthodes de dédoublement élaborées dans la section 3, a été soumis aux conditions d'épimérisation-hydrolyse "one pot" avec la soude méthanolique (Schéma 96). Les *N*-Boc-*trans*-aminoacides correspondants **(+)-151** et **(-)-151** ont été isolés avec des rendements quantitatifs. Chacun de ces dérivés a été déprotégé selon la méthode déjà établie en série racémique, avec le TFA dans le chlorure de méthylène pour fournir les aminoacides **(-)-110** et **(+)-110** avec 84 et 86 % de rendement.

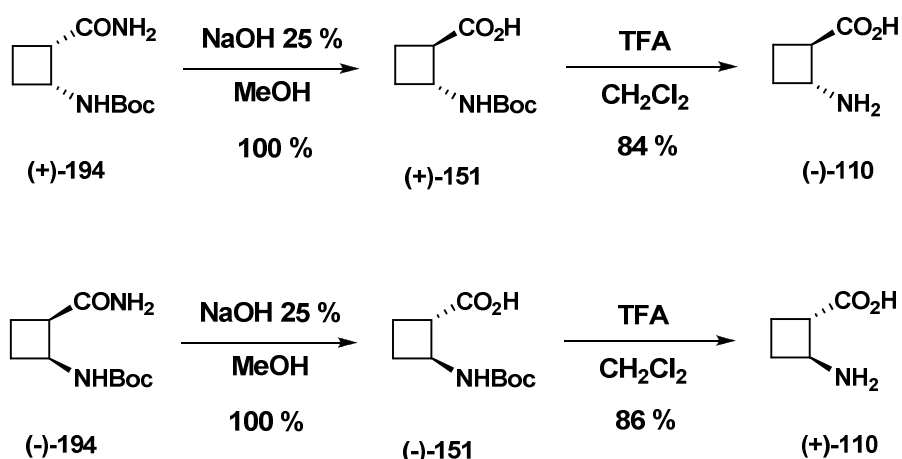


Schéma 96

Nous avons déterminé des excès énantiomériques supérieurs à 97 % pour chaque énantiomère grâce à une analyse par HPLC sur colonne chirale (*cf.* partie expérimentale).

L'objectif principal de cette étude, à savoir établir une nouvelle voie de synthèse pour les énantiomères du *trans*-ACBC a été atteint. En marge de cette étude, nous avons mis au point un accès rapide aux énantiomères du *cis*-ACBC (Schéma 97). Chacun des amides **(+)-194** et **(-)-194** a été traité par les conditions d'hydrolyses utilisant l'acide nitrososulfurique : les *cis*-acides **(+)-105** et **(-)-105** ont été obtenus avec 93 % et 89 % de rendement respectivement et des excès énantiomériques supérieurs à 97 % (*cf.* partie expérimentale).

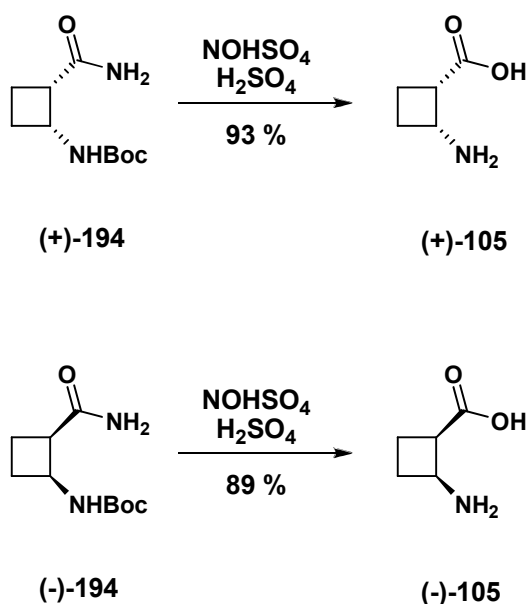


Schéma 97

6) Bilan de la 2^{ème} méthode de synthèse

Nous présentons sous forme d'un seul schéma l'ensemble des démarches de cette seconde voie d'accès aux quatre stéréoisomères de l'ACBC (Schéma 98). Le point de départ est le racémique *cis*-acide (**±**)-**105**. Nous l'avons obtenu selon la méthode utilisée par le laboratoire, mais il convient de souligner qu'il est également accessible par d'autres méthodes simples qui ne nécessitent pas de recours à une étape photochimique.

L'acide racémique (**±**)-**105** est d'abord protégé sur l'amine par un groupement Boc pour donner l'acide (**±**)-**149**. Dans la première approche que nous avons développée, l'acide (**±**)-**149** est couplé avec la (*R*)- α -méthylbenzylamine (**–**)-**10** pour conduire aux diastéréoisomères (**+**)-**187** et (**+**)-**188** avec un rendement de 85 %. Une fois les diastéréoisomères séparés par chromatographie, ils sont débenzylés en présence de sodium dans l'ammoniac, pour conduire aux deux amides primaires énantiomères (**+**)-**194** et (**–**)-**194**. Dans la seconde approche de dédoublement, le couplage de l'acide (**±**)-**149** a été réalisé avec la (*R*)- α -*para*-méthoxy-méthylbenzylamine (**–**)-**174** pour former les diastéréoisomères (**–**)-**189** et (**–**)-**190**. Ceux-ci ont été séparés, puis, débenzylés avec le CAN pour conduire aux deux amides énantiomères (**+**)-**194** et (**–**)-**194**.

A partir de ces composés, nous avons la possibilité de synthétiser les 4 stéréoisomères de l'ACBC. Les deux énantiomères *cis*-(**1S,2R**)-**105** et *cis*-(**1R,2S**)-**105** sont obtenus directement par action de l'acide nitrososulfurique avec des rendements atteignant 90 %. Alors que les deux énantiomères *trans*-(**1S,2R**)-**110** et *trans*-(**1R,2S**)-**110** sont obtenus en deux étapes. L'épimérisation et hydrolyse des amides primaires correspondant forme quantitativement les acides-carbamates **151**, lesquels sont simplement déprotégés en présence de TFA. Le rendement global de ces deux étapes atteint 88 %.

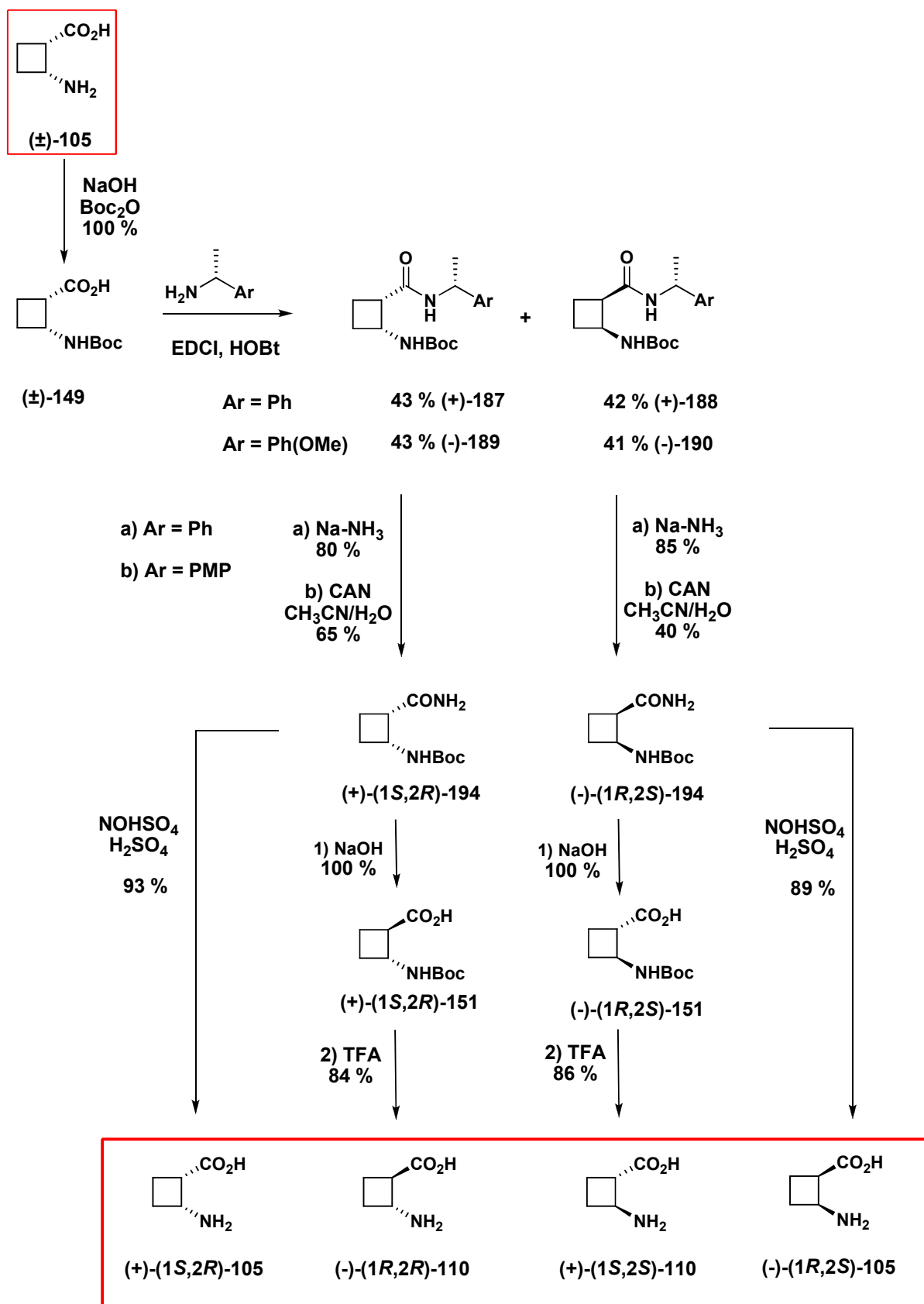


Schéma 98

Depuis le racémique *cis*-ACBC (**±**)-**105** et en 4 étapes, nous avons obtenu les énantiomères *cis*-(**1S,2R**)-**105** et *cis*-(**1R,2S**)-**105** avec un rendement global de 67 %. Toujours à partir de l'acide *cis*-(**±**)-**105** et en 5 étapes, nous avons isolé les énantiomères *trans*-(**1S,2R**)-**110** et *trans*-(**1R,2S**)-**110** avec un rendement global de 62 %. Les excès énantiomériques déterminés par chromatographie chirale pour les quatre stéréoisomères de l'ACBC étaient supérieurs à 97 %.

7) Comparaison de la 1^{ère} et de la 2^{ème} méthode de synthèse

Nous avons défini plusieurs points de comparaison entre la 1^{ère} et la 2^{ème} méthode de synthèse des 4 stéréoisomères de l'ACBC (1^{ère} méthode : page 64, 2^{ème} méthode : page 81). Ces points sont basés sur le nombre d'étapes nécessaires pour accéder aux énantiomères du *cis*-ACBC et du *trans*-ACBC, mais également sur le rendement global de chaque synthèse. Nous avons résumé ces points de comparaison dans le tableau 12.

Méthode \ Points	<i>cis</i> -ACBC (+)- 105 et (-)- 105	Rdt global (%)	<i>trans</i> -ACBC (+)- 110 et (-)- 110	Rdt global (%)
1 ^{ère} méthode	7 étapes	29	12 étapes	7
2 ^{ème} méthode	7 étapes	42	8 étapes	46

Tableau 12

Que ce soit dans la 1^{ère} ou la 2^{ème} méthode, l'accès aux *cis*-ACBC énantiopurs (+)-**105** et (-)-**105** se fait avec le même nombre d'étapes. Par contre, nous voyons que le rendement global pour fournir les deux énantiomères a augmenté de 44 % entre la 2^{ème} à la 1^{ère} méthode. A cet instant, nous avons déjà optimisé l'accès aux énantiomères (+)-**105** et (-)-**105** *via* le dédoublement racémique.

L'accès aux *trans*-ACBC énantiopurs se fait beaucoup plus rapidement par la 2^{ème} méthode (8 étapes) alors que 12 étapes sont nécessaires pour la 1^{ère} méthode. Le rendement global pour donner les deux énantiomères, quant à lui, suit la même tendance avec un rendement passant de 7 à 46 %, soit 6.5 fois supérieur.

Nous pouvons également faire un point de comparaison au regard du coût de la synthèse des 4 stéréoisomères. Dans la 1^{ère} méthode, il est impératif d'utiliser des réactifs onéreux pour former la copule chirale (+)-**129**. Dans la seconde méthode, nous avons utilisé des

réactifs commerciaux bon marché, tel que l'uracile ou bien la (*R*)- α -méthylbenzylamine pour former les amides diastéréoisomères.

En résumé, nous pouvons dire que nous avons mis au point deux voies de synthèse complémentaires des 4 stéréoisomères de l'ACBC. La première voie est une synthèse diastéréosélective alors que la seconde voie est un dédoublement racémique.

Cependant, la seconde voie possède des qualités plus intéressantes pour la synthèse multigrammes des 4 stéréoisomères : un nombre d'étapes réduit, un rendement d'épimérisation quantitatif, des rendements convenables, et enfin, un coût plus faible des réactifs utilisés lors de la synthèse.

Pour conclure sur le bilan de la synthèse des stéréoisomères de l'ACBC, il est important de dire que quelle que soit la voie utilisée, il s'agit de la première synthèse du *trans*-ACBC sous forme énantiomériquement pure.

Avec la synthèse du *trans*-ACBC énantipure établie, nous nous sommes tournés vers la préparation d'homo-oligomères de ce β -aminoacide.

IV-PREPARATION D'OLIGOMERES

DU *trans*-ACBC

Dans l'introduction, nous avons annoncé comme objectifs principaux, la préparation et l'étude conformationnelle d'oligomères du *trans*-ACBC. Dans les chapitres précédents, nous avons élaboré deux synthèses complémentaires pour accéder aux isomères optiquement enrichis du *trans*-ACBC. Dans ce chapitre, nous détaillerons les synthèses d'homooligopeptides du *trans*-ACBC. Nous avons voulu ainsi préparer le dimère, le tétramère, l'hexamère et l'octamère du *trans*-ACBC, pour ensuite étudier en solution et à l'état solide, la ou les conformations adoptées pour chacun d'eux (Figure 54).

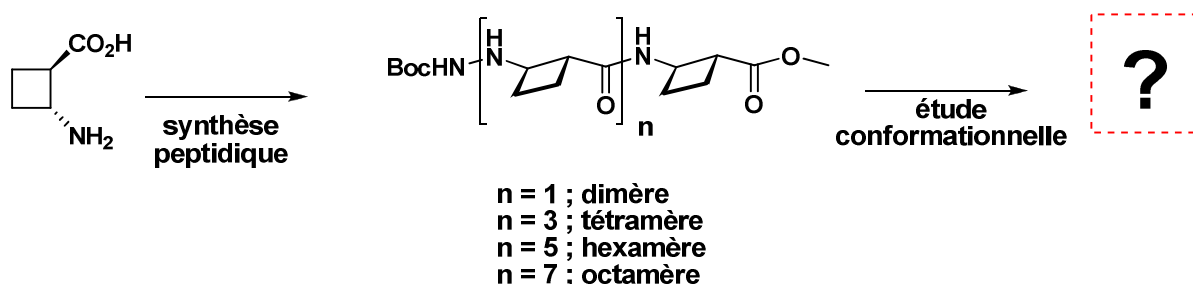


Figure 54

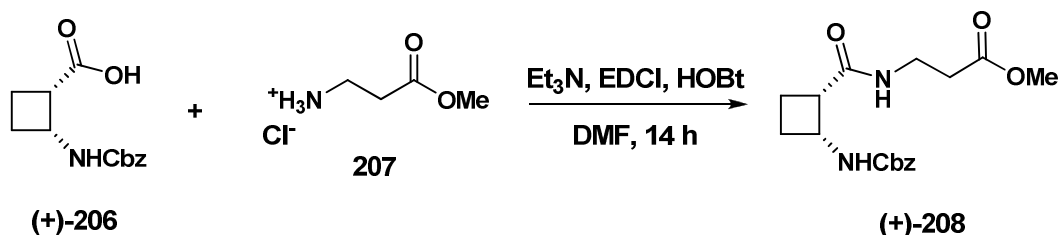
Dans la synthèse de chaque oligomères du *trans*-ACBC, nous avons travaillé avec le (–)-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACBC. Nous avons fait ce choix pour avoir un point de comparaison avec les résultats d'analyse conformationnelle décrits par Gellman *et coll.* au travers des études menées sur les oligomères du (1*R*,2*R*)-*trans*-ACPC et –*trans*-ACHC.

La synthèse de β -peptides peut être réalisée avec les méthodes de synthèse utilisées pour les α -peptides, à savoir, en phase liquide ou bien en phase supportée.

Gellman *et coll.* et Seebach *et coll.* ont utilisés la synthèse en phase liquide, afin de préparer des β -peptides de petite taille³. C'est ainsi que Gellman *et coll.* ont pu préparer les oligomères du *trans*-ACHC³⁹. L'automatisme s'est généralisé en synthèse peptidique avec la synthèse sur support solide, augmentant l'efficacité en terme de temps et de rendement.

Ortuño *et coll.* qui ont travaillé sur les oligomères du *cis*-ACBC, les ont synthétisés en phase liquide⁸⁶. Comme nous travaillions sur l'isomère du *cis*-ACBC, nous avons décidé d'utiliser le protocole de couplage peptidique proposé par ces auteurs. et plus particulièrement pour la synthèse du dimère du **(+)-(1*S*,2*R*)-208** (Schéma 99).

Selon ce protocole, les deux partenaires **(+)-206** et **207** ont été couplés en présence de EDCI/HOBt, à température ambiante et dans le DMF, pour fournir le dimère **(+)-208** avec un rendement de 86 %.



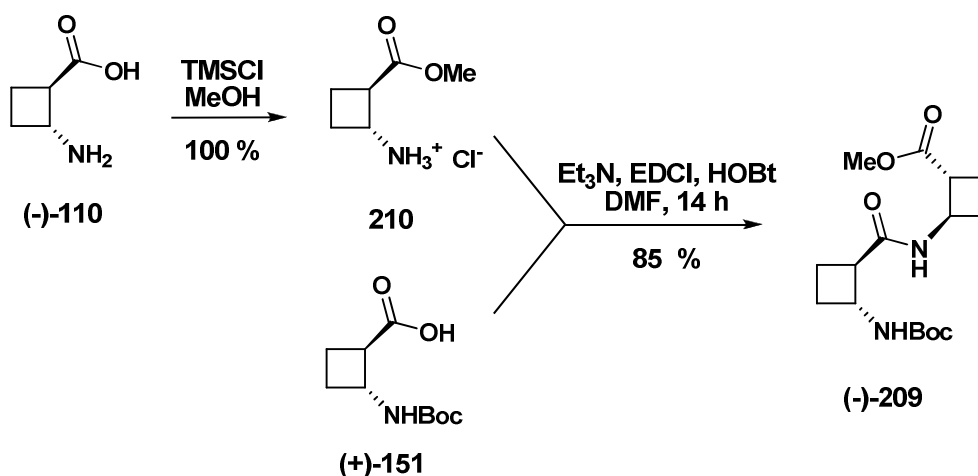
Dans la création d'une liaison peptidique entre deux partenaires β -aminoacides cyclobutaniques, il apparaît une difficulté spécifique au cyclobutane. Nous avons vu que les β -aminoacides cyclobutaniques étaient sujet à une ouverture de cycle induit par l'amine libre en β du carbonyle (*cf.* section 3.a, p. 54). Cette réactivité intrinsèque du cycle peut compliquer le couplage et il est donc important de trouver des conditions qui favorisent le couplage : par une activation rapide de l'acide carboxylique d'un partenaire, suivi par la condensation de l'amine libre sur l'acide activé.

Nous avons donc suivi les conditions de couplage décrites par Ortuño *et coll.* pour réaliser la synthèse des oligomères du *trans*-ACBC, et nous sommes passés à l'application sur le composé **(-)-(1*R*,2*R*)-110**.

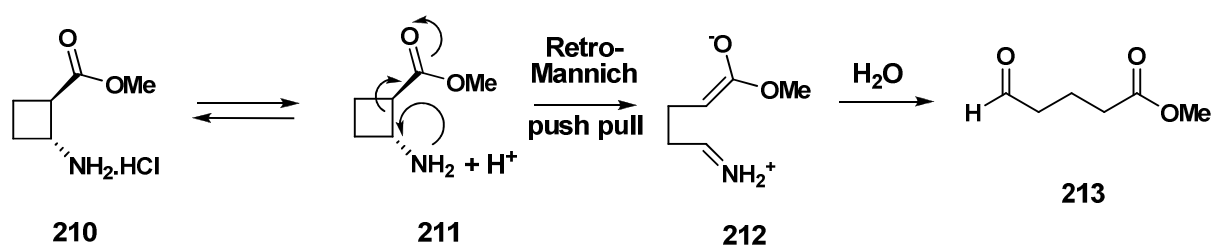
a) Synthèse du dimère **(-)-209**

Notre objectif premier était d'accéder au carbamate-ester **(-)-(1*R*,2*R*)-150**, pour ensuite déprotéger sélectivement l'acide ou l'amine. Cependant, il est concevable d'aboutir au même résultat à partir de l'aminoacide libre **(-)-(1*R*,2*R*)-110**. Nous avons pu ainsi former le chlorhydrate de l'aminoester **210** à partir de **(-)-110**, par traitement avec de 2 équivalents de TMSCl dans le méthanol et à température ambiante. Le composé **210** isolé avec un rendement quantitatif, a été facilement récupéré sous forme de cristaux blancs. Nous avons ensuite couplé celui-ci avec l'acide **(+)-151**, dans le DMF en présence d'1 équivalent de triéthylamine, 1 équivalent de HOBt et 1,5 équivalent d'EDCI. Après 12 heures d'agitation à

température ambiante, nous avons obtenu le dimère **(-)-209** avec un rendement de 85 %, après purification par chromatographie (Schéma 100).



En complément de la synthèse du dimère **(-)-209**, nous avons mené une étude sur la stabilité de l'intermédiaire **210**. Nous avons mis le composé **210** en solution dans l'eau deutérée et nous avons observé par RMN, l'évolution du milieu au cours du temps. Au bout de 6 heures, un nouveau produit était apparu. Après interprétation des spectres de RMN, nous avons déterminé la structure de ce composé : il s'agissait de l'aldéhyde **213** issu de l'ouverture de cycle en milieu acide (Schéma 101).



Effectivement, le spectre de RMN du ^1H met en évidence l'apparition de l'aldéhyde au cours du temps, identifié par le pic caractéristique du proton aldéhydique à 9,71 ppm (Figure 55). Au cours du temps, nous avons observé l'augmentation de la quantité de **213** et la diminution de celle de **210**.

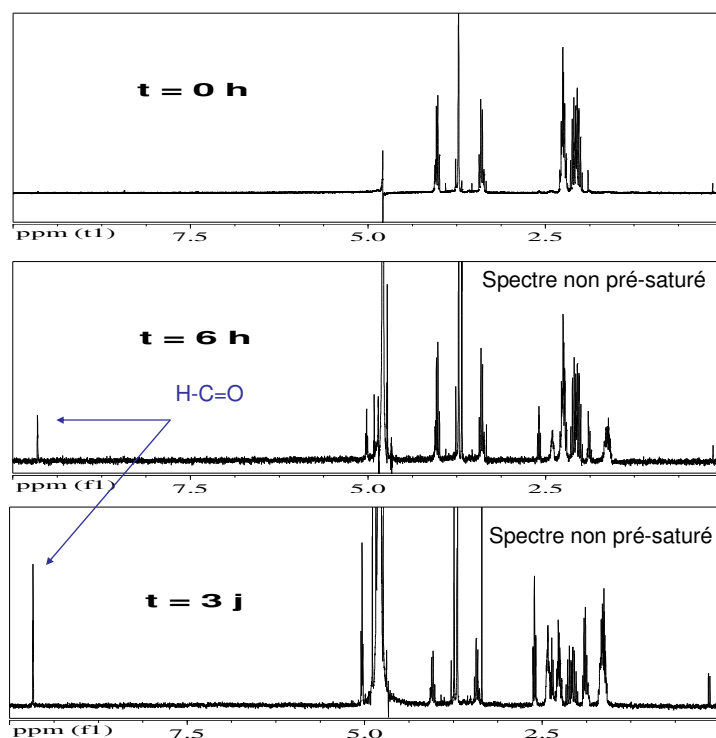


Figure 55

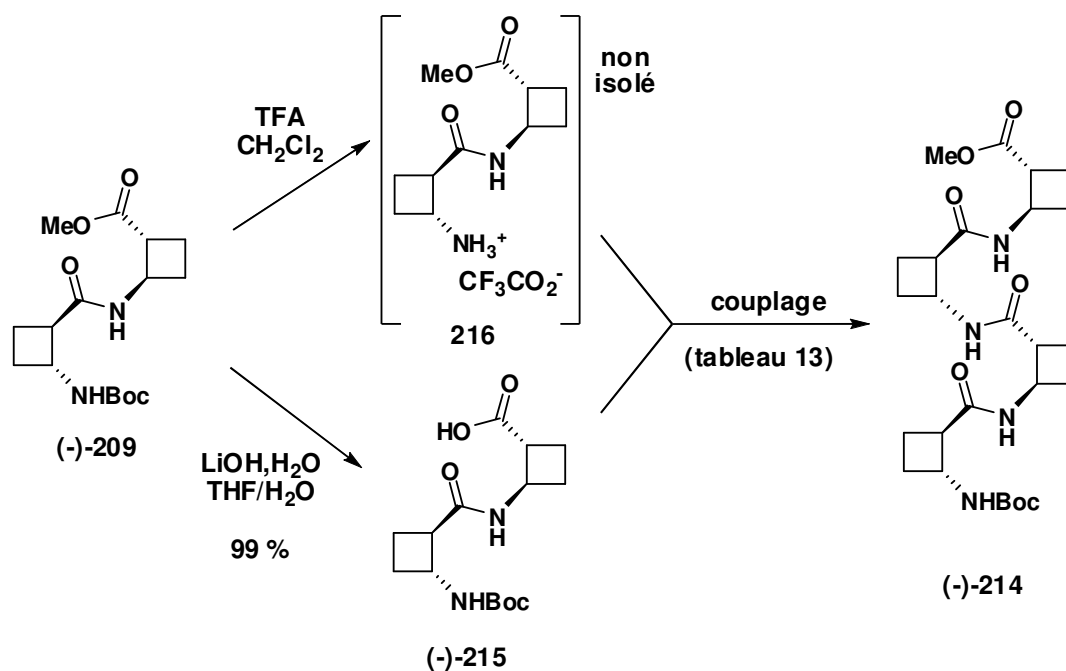
Avec notre expérience sur l'ouverture de cycle des dérivés du *cis*-ACBC en milieu acide, nous nous attendions fortement à ce type de réactivité. Ortuño *et coll.* avaient également montré l'instabilité du dérivé aminoester du *cis*-ACBC. Nous pouvons en conclure que tant les dérivés du *cis*- et *trans*-ACBC, avec la fonction amine libre, sont sujets au phénomène d'ouverture de cycle.

Il est important d'optimiser l'efficacité du couplage pour éviter la dégradation du partenaire avec la fonction amine disponible.

b) Synthèse du tétramère (–)-214

Dans un premier temps, un échantillon du dipeptide (–)-209 a été saponifié par l'action d'un équivalent de lithine à température ambiante pour fournir l'acide (–)-215 correspondant avec un rendement de 99 %. Un autre échantillon du dimère (–)-209 a été soumis à un traitement avec le TFA dans le dichlorométhane pour déprotéger la partie *N*-terminale. L'intermédiaire 216 n'a pas été isolé, mais a été immédiatement engagé dans une réaction de couplage avec le dipeptide acide (–)-215. Différentes conditions de couplage peptidique ont été étudiées afin d'optimiser la formation du térapeptide (–)-214 (Schéma 102). Nous avons

sélectionné des réactifs de couplage offrant des caractéristiques de couplages variées. Les résultats de cette étude sont présentés dans le tableau 13.



Entrée	Réactifs de couplage (éq.)	Solvant	Base	Temp.	Temps	Rdt (%) (-)-214
1	EDCI.HCl (1.5) / HOBt (1)	DMF	Et ₃ N	t.a.	24 h	38
2	TFFH (1.5)	CH ₂ Cl ₂ /H ₂ O	Na ₂ CO ₃	t.a.	24 h	45
3	HATU (1.2)	DMF	DIPEA	t.a.	24 h	74
4	FDPP (1.2)	DMF	DIPEA	t.a.	24 h	93

EDCI.HCl : chlorhydrate de 1-(3-diméthylaminopropyl)-3-éthylcarbodiimide

TFFH : hexafluorophosphate de fluoro-*N,N,N',N'*-tétraméthylformamidinium

HATU : hexafluorophosphate de *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tétraméthyluronium

FDPP : diphenylphosphinate de pentafluorophényle

DIPEA : diisopropyléthylamine

Tableau 13

Dans un premier temps, nous avons utilisé les conditions décrites pour préparer le dipeptide **(-)-209**, c'est-à-dire EDCI/HOBt dans le DMF (entrée 1). Malheureusement, cette méthode n'a permis d'isoler le térapeptide qu'avec un rendement de 38 %.

D'autres réactifs réputés pour le couplage de résidus encombrés, ont donné de meilleurs résultats. L'utilisation du sel d'amidinium TFFH¹³⁹ paraissait une méthode d'activation

¹³⁹ Carpino, L. A. ; El-Faham, A. *J. Am. Chem. Soc.* **1995**, 117, 5401-5402

intéressante. Ainsi, nous avons engagé l'acide (–)-**215** avec le TFFH dans un milieu biphasique (dichlorométhane/eau) en présence de Na₂CO₃ et de **216** pour conduire à (–)-**214** avec un rendement de 45 % (entrée 2). L'utilisation des sels d'uronium à la place des carbodiimides dans le couplage peptidique ont donné de très bons résultats. Nous avons traité (–)-**215** et **216** avec le HATU dans le DMF en présence de DIPEA¹⁴⁰, et après 24 heures de réaction, nous avons pu isoler le tétramère (–)-**214** à hauteur de 74 % (entrée 3). En dernier lieu, nous avons testé le FDPP¹⁴¹, qui appartient au groupe des dérivés diphénylphosphinates. Celui-ci a été mis en réaction avec (–)-**215** et **216** dans le DMF en présence de DIPEA pour fournir le tétrapeptide avec 93 % de rendement (entrée 4).

Nous avons retenu les conditions donnant le meilleur rendement, c'est-à-dire, l'utilisation du FDPP comme réactif de couplage peptidique pour la préparation des oligomères à plus longue chaîne.

c) Synthèse de l'hexamère (–)-**217**

Comme nous avons à notre disposition le dipeptide (–)-**209** et le tétrapeptide (–)-**214**, il paraissait judicieux de coupler ces deux partenaires pour former l'hexapeptide (–)-**217**.

La construction de l'hexapeptide (–)-**217** peut s'envisager par deux voies selon que le dimère ou le tétramère sont déprotégés sur la partie C- ou N-terminale. Pour notre part, nous avons décidé arbitrairement de saponifier le dipeptide (–)-**209** et de déprotéger l'amine de (–)-**214**.

C'est ainsi que le dimère (–)-**209** a été saponifié en présence de lithine pour accéder à l'acide (–)-**215** avec un rendement de 99 %. Le tétramère (–)-**214** a été traité avec du TFA dans le dichlorométhane pour former le sel **218** que nous avons engagé directement dans le couplage avec (–)-**215**, dans le DMF, en présence de FDPP et de DIPEA. Après une nuit d'agitation, nous avons purifié le brut réactionnel par chromatographie et avons isolé l'hexamère (–)-**217** avec un rendement de 75 % (Schéma 103).

¹⁴⁰ Carpino, L. A. *J. Am. Chem. Soc.* **1993**, *115*, 4397-4398

¹⁴¹ Shaoqing, C. ; Xu, J. *Tetrahedron Lett* **1991**, *32*, 6711-6714

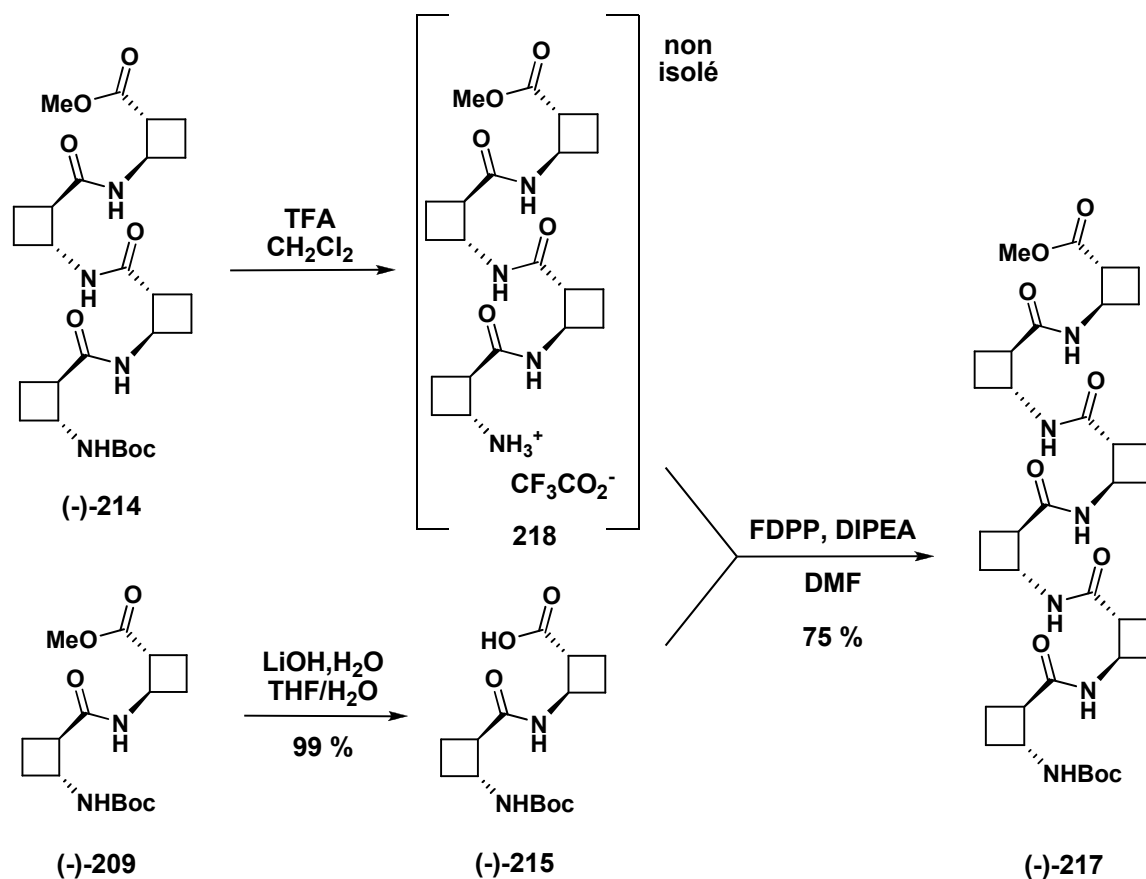


Schéma 103

d) Synthèse de l'octamère (-)-219

L'octamère (-)-219 pouvait être obtenu selon deux stratégies, soit par condensation de l'hexamère (-)-217 avec le dimère (-)-209, soit par condensation de deux partenaires tétrapeptide (-)-214. Nous avons choisi de préparer le composé (-)-219 par cette dernière voie.

Dans un premier temps, un échantillon du tétrapeptide (-)-214 a été saponifié par action de la lithine à température ambiante pour fournir l'acide (-)-220 correspondant avec un rendement de 99 %. Un autre échantillon du tétramère (-)-214 a été soumis à un traitement avec du TFA dans le dichlorométhane pour déprotéger la partie *N*-terminale. L'intermédiaire 218 a été immédiatement engagé dans le couplage avec (-)-220, en présence de FDPP et de DIPEA, dans le DMF et à température ambiante. Après une nuit d'agitation, nous avons pu isoler l'octapeptide (-)-219 désiré avec un rendement de 56 % (Schéma 104).

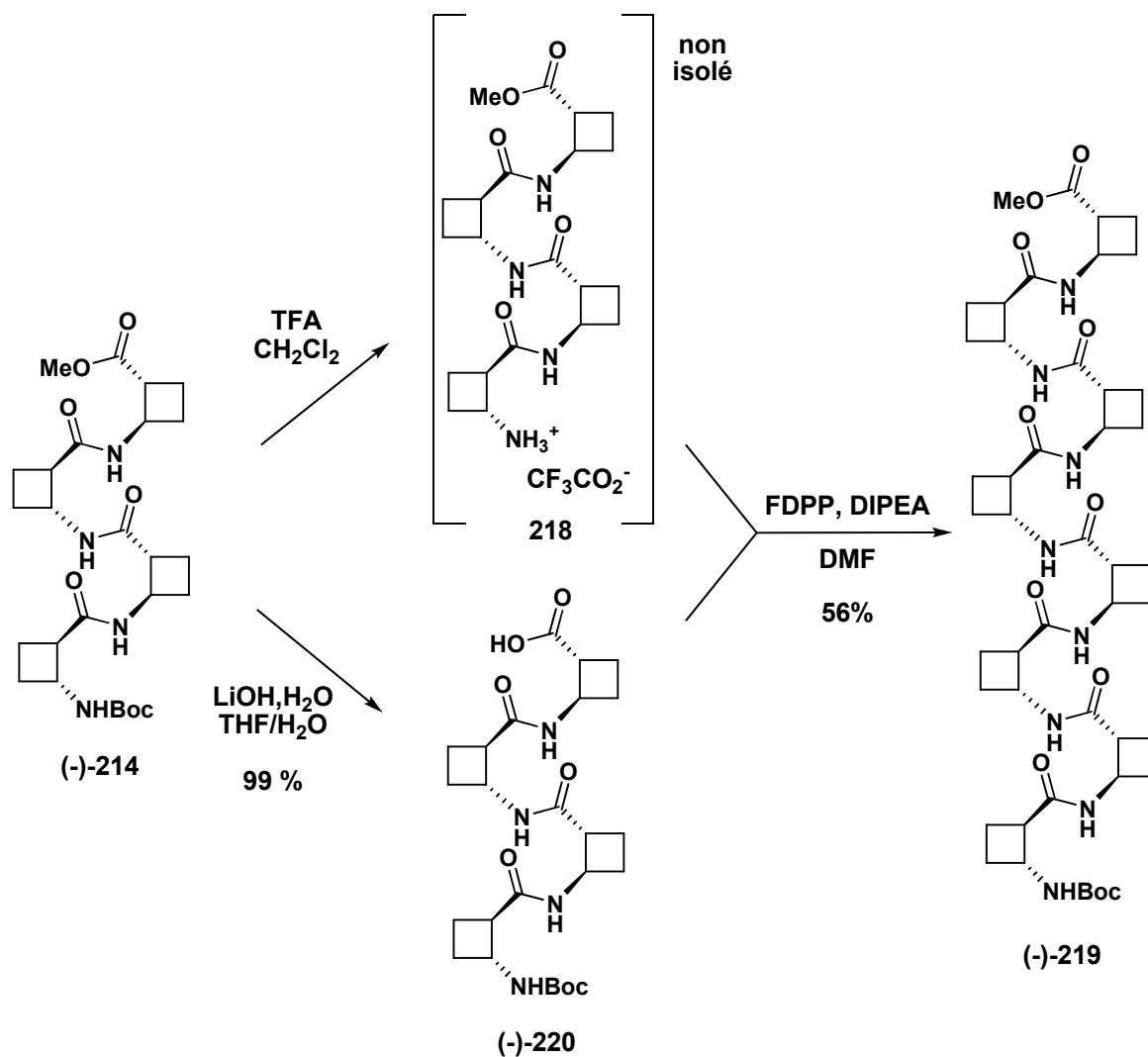


Schéma 104

Ainsi, avec des méthodes de couplage adaptées, nous avons pu préparer le dimère, le tétramère, l'hexamère et l'octamère du $(-)-(1R,2R)\text{-trans-ACBC}$ **110**. Ces différents oligomères ont été obtenus avec des rendements corrects et ont été facilement purifiés par chromatographie éclair sur gel de silice. Ces β -peptides ont tous été obtenus sous forme de cristaux blancs et collants.

Chacun des oligomères est stable à l'air et à température ambiante. Ils sont facilement solubles dans les solvants halogénés couramment utilisés (dichlorométhane, chloroforme), ainsi que dans le méthanol. La structure primaire de chaque composé a été déterminée par l'interprétation des spectres de RMN du ^1H et du ^{13}C à une et deux dimensions.

**RESULTATS ET
DISCUSSIONS :
DEUXIEME PARTIE –
ANALYSE
CONFORMATIONNELLE**

I-TECHNIQUES D'ANALYSE DE β-PEPTIDES

1) Rappels bibliographiques

Dans l'introduction, nous avons présenté toutes les structures régulières qu'adoptent les β-peptides. Ces structures régulières ont été mises en évidence par l'utilisation de différentes techniques physiques complémentaires. Les techniques spectroscopiques les plus couramment utilisées sont la résonance magnétique nucléaire^{41,142}, l'infrarouge¹⁴³, le dichroïsme circulaire électronique^{40,144}, ainsi que la microscopie à balayage électronique¹⁴⁵ et les rayons X¹⁴⁶. Nous allons détailler dans cette partie bibliographique ces méthodes en illustrant chacune d'elles par un ou plusieurs exemples appliqués à la détermination structurale de β-peptides et de leurs dérivés.

a) La RMN

La spectroscopie par Résonance Magnétique Nucléaire est la méthode par excellence pour déterminer la structure secondaire de protéines et de peptides en solution. La RMN à une, deux et trois dimensions est utilisée conjointement dans l'élucidation de ces structures. Mais ici, nous nous limiterons à la RMN à une et deux dimensions.

i) La spectroscopie par RMN 1D

a) Effets de la température sur le déplacement chimique

Dans les structures ordonnées de type hélice ou feuillet, il existe des phénomènes tendant à stabiliser l'architecture moléculaire. Ces phénomènes sont des interactions non-covalentes

¹⁴² a) Gunther, H. *NMR spectroscopy*, John Wiley & Sons: New-York, **1995**, b) Berl, V. ; Krtsche, M. J. ; Huc, I. ; Lehn, J. M. ; Schmutz, R. *Chem. Eur. J.* **2000**, *122*, 1938-1946

¹⁴³ a) Nakanishi, K. ; Solomon, P. H. ; *Infrared Absorption Spectroscopy*, Emerson-Adams Press: New-York, **1996**, b) Gardner, R. R. ; Liang, G. B. ; Gellman, S. H. *J. Am. Chem. Soc.* **1999**, *117*, 1806-1816

¹⁴⁴ a) Johnson, J. W. C. *Methods Biochem. Anal.* **1985**, *31*, 61-163, b) Berova, N. ; Nakanishi, K. ; Woody, R. W. *Circular dichroism : principles and applications*, 2nd ed., Wiley-VCH, **2000**

¹⁴⁵ Watt, I. M. *The principles and Practice of electron microscopy*, Cambridge University Press: New-York, **1996**

¹⁴⁶ Stout, G. H. ; Jensen, L. H. *X-Ray structure determination: A Pratical Guide*, John Wiley & Sons: New-York, **1989**, b) Krämer, R. ; Lehn, J. M. ; Marquis-Rigault, A. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **1993**, *90*, 5394-5398

telles les liaisons hydrogène, formées essentiellement entre le couple $C=O \cdots H-N$ des liaisons peptidiques. Des expériences de RMN à haute température sont conduites afin d'étudier la région des protons d'amides. L'étude de cette région apporte beaucoup d'informations sur l'abondance de liaisons hydrogène intramoléculaires et l'existence de structuration secondaire.

En fonction de la température, il est possible d'obtenir des informations grâce aux trois paramètres suivants :

- 1- la conservation des valeurs de constante couplage (J), liées aux angles dièdres $H-N-C_{\beta}-H$, indique une structure fortement ordonnée
- 2- la conservation de la dispersion des déplacements chimiques causés par l'environnement d'une l'hélice est une preuve de structuration secondaire
- 3- de faibles coefficients de température (≥ 6 ppb/K), c'est-à-dire, la fluctuation des déplacements chimiques des hydrogènes NH d'amides en fonction de la température, nous indique l'existence de liaisons hydrogènes intramoléculaires.

Seebach *et al.* ont démontré la validité de ces méthodes sur le β -heptapeptide **221**, modèle pour leur études expérimentales et théoriques¹⁴⁷. Ce β -peptide a montré une propension à former une hélice H-14 (Figure 56). Les expériences par 1D RMN du 1H ont été réalisées dans le CD_3OD et à différentes températures (298 à 393 K). Ensuite, les régions NH de chaque spectre pour chaque température ont été superposées afin d'observer l'évolution des déplacements chimiques de cette région (Figure 57).

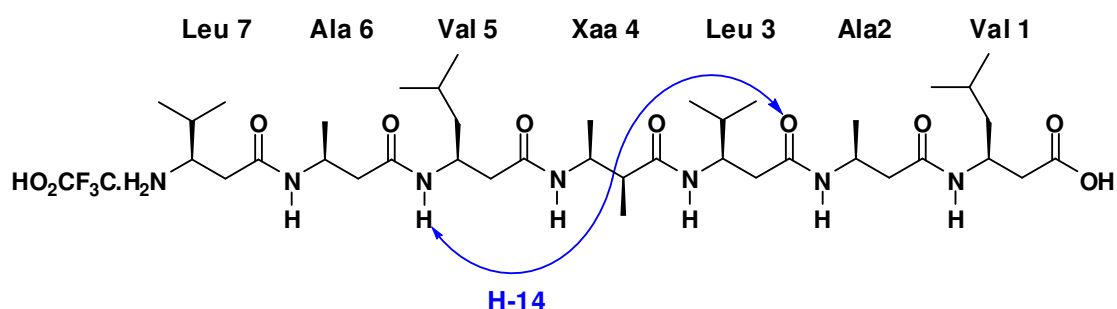


Figure 56 : heptapeptide **221**

¹⁴⁷ Gademann, K. ; Bernahrd, J. ; Seebach, D. *Helv. Chem. Acta.* **1999**, 82, 1-11

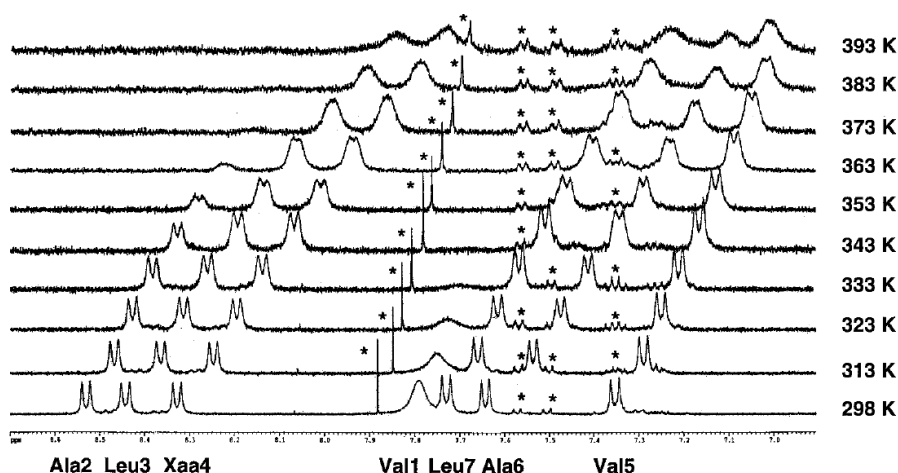


Figure 57

L'étude de la variation des constantes de couplages a montré qu'il y avait une faible variation en fonction de la température (Tableau 14).

Table 2. 3J Values (in Hz) for the Coupling between NH and C(β)–H Protons in β -Peptide **1**

T/K	β -HAla ²	β -HLeu ³	β -HXaa ⁴	β -HLeu ⁷	β -HAla ⁶	β -HVal ⁵
298	9.1	9.4	9.0	9.4	8.6	9.4
313	9.0	9.4	8.9	9.4	8.6	9.4
323	9.0	9.2	9.0	9.4	8.4	9.5
333	9.0	8.9	8.7	8.7	8.6	9.4
343	8.9	8.9	8.6	9.1	8.2	9.1
353	8.4	9.0	8.5	8.7	7.8	9.0

Tableau 14

De même, la variation de la dispersion chimique entre plusieurs couples de protons NH a été négligeable. A titre d'exemple, la différence de déplacement chimique entre le NH de la β^3 -**hLeu-3** et le NH de la β^3 -**hVal-5** a été de 0,89 ppm à 298 K, pour 0,84 ppm à 393 K.

Enfin, une étude a été menée sur le coefficient de température de chaque proton NH (Figure 58). Si la magnitude du coefficient de température est supérieure à 6 ppb/K (ou < -6 ppb/k), cela traduit l'existence de liaisons hydrogène intramoléculaires de type $N-H \cdots O=C$. Après traitement des données de RMN 1H à une dimension, les coefficients de température des hydrogènes d'amides étaient situés entre -2 et -6 ppb/K.

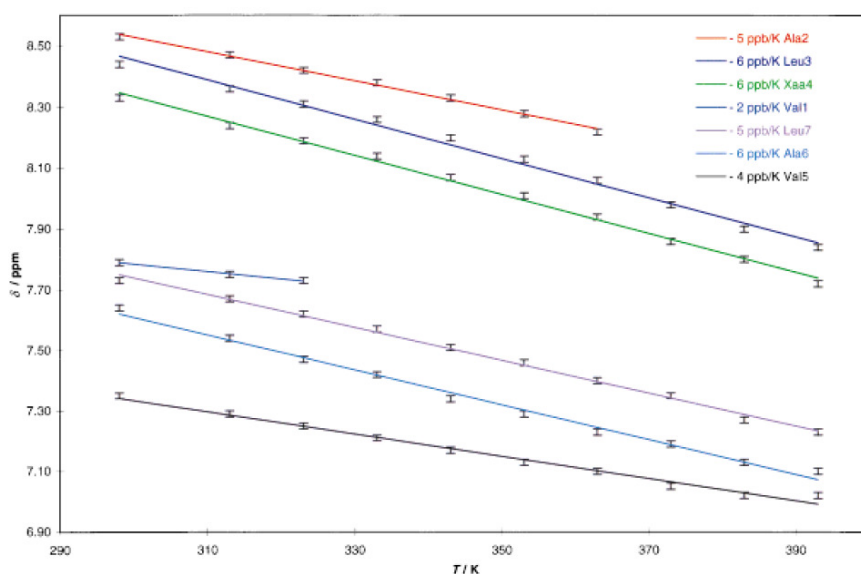


Figure 58

Il est à noter que le coefficient de température peut être établi sur les protons $C_{\alpha}H$ et les $C_{\beta}H$. Si le déplacement chimique de ces hydrogènes n'évolue pas avec la température alors qu'il dépend de l'environnement spatial, nous sommes en présence d'une structuration forte du système.

b) Force des liaisons hydrogènes

L'échange isotopique est une méthode qui met en évidence l'existence de liaisons hydrogènes intramoléculaires dans un peptide. Il existe deux protocoles pour réaliser cet échange isotopique. Un premier protocole implique l'emploi d'un solvant protique deutéré, comme le méthanol (CD_3OD), qui a le double rôle de dissoudre le peptide et de servir de source isotopique. Un second protocole consiste à introduire une infime quantité d'eau lourde (D_2O) dans un échantillon contenant le peptide, lequel est déjà dissout dans un solvant aprotique. Quel que soit le protocole adopté, l'avancement de l'échange isotopique dans le temps est suivi par spectroscopie RMN 1H .

Une deuxième méthode repose sur la mise en évidence de la force des liaisons hydrogènes par l'ajout successif de DMSO deutéré ($DMSO-d_6$) dans une solution de β -peptide. Le DMSO possède un dipôle qui va favoriser les liaisons hydrogènes avec les NH amidiques. Ainsi, en fonction de la concentration de $DMSO-d_6$ dans l'échantillon, le déplacement chimique de NH sera déplacé vers les bas champs. Claridge *et al.* ont utilisé cette technique pour démontrer la stabilité des liaisons hydrogènes du β -peptide **222** qui se structure en hélice H-10⁴⁶ (Figure 59).

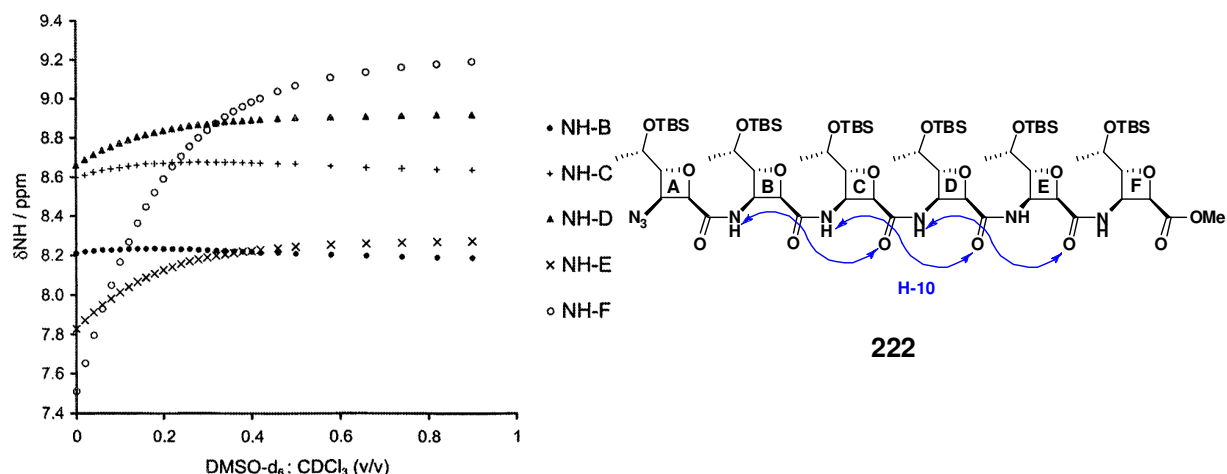


Figure 59 : hexapeptide 222

On constate que les hydrogènes NH des résidus E et à fortiori F, sont les plus affectés par l'addition progressive de solvant dénaturant dans l'échantillon. Cela indique que ces deux hydrogènes ne sont pas inclus dans une liaison hydrogène intramoléculaire.

ii) La spectroscopie par RMN 2D

La spectroscopie par RMN à deux dimensions est incontournable dans l'élucidation de la structure secondaire des peptides et des protéines. Les techniques les plus couramment utilisées sont la NOESY (Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy) et la ROESY (Rotational Overhauser Effect Spectroscopy). Ce sont deux des méthodes spectroscopiques mettant en évidence des interactions entre le spin magnétique de deux hydrogènes proches dans l'espace, et ce type d'interactions est appelé couplage dipolaire. Il se différencie du couplage scalaire qui passe par un réseau d'atomes (Figure 60).

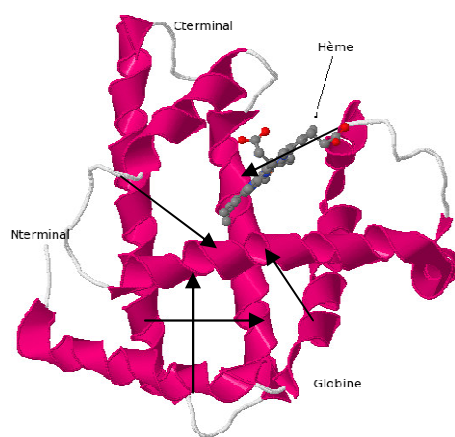


Figure 60 : interactions dipolaires ^1H - ^1H (NOESY)

Il est important de souligner que l'intensité des corrélations entre les deux protons d'un couple, est inversement proportionnelle à la racine sixième de la distance qui les sépare.

Nous avons donc l'équation suivante :

$$r_{ij} = r_{\text{ref}} \times (a_{ij} / a_{\text{ref}})^{1/6}$$

où r_{ij} : distance calculée entre les atomes homonucléaires i et j

r_{ref} : distance du couple de protons référence

a_{ij} : volume de la corrélation ij

a_{ref} : volume de la corrélation de référence

Ainsi, selon ce rapport, il n'est plus possible de détecter des corrélations au-delà de 5 Å.

La distance qui sépare deux protons d'un couple est calculée par la mesure de l'intensité de la corrélation dipolaire et en la rapportant à une intensité d'un couple de référence.

Pour chaque type d'hélice β identifié à ce jour, il existe des corrélations spécifiques qui permettent de définir sans équivoque la nature de l'hélice (Figure 61). En général, les effets nOe à longue portée sont les meilleurs indicateurs de toutes les structures secondaires (Tableau 15).

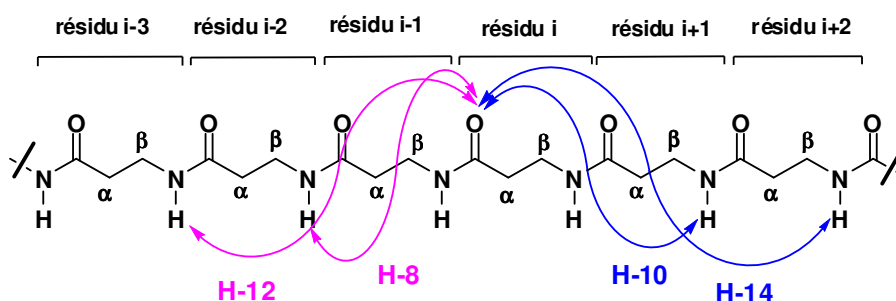


Figure 61

Hélices de β -peptides	3J (NH- H_β) Hz	NOE observées
Hélice H-14	8,5-10	NH_i-NH_{i+1} , $-C_\alpha H_{i-1}$, $-C_\alpha H_i$, $-C_\beta H_{i+2}$, $-C_\beta H_{i+3}$
Hélice H-12	8-9	$NH_i-C_\beta H_{i+2}$; $C_\beta H_i-C_\alpha H_{i+2}$, $-NH_{i+3}$
Hélice-10/12	7-9	$NH_i-C_\beta H_{i+2}$, $-C_\beta H_{i+3}$, $-C_\beta H_{i-2}$, $-C_\beta H_{i-3}$, $-C_\alpha H_{i+2}$; $C_\beta H_i-C_\alpha H_{i+2}$, $-C_\alpha H_{i+3}$
Hélice H-10	-	$NH_i-C_\beta H_{i+2}$, $-C_\beta H_{i+1}$, $C_\beta H_i-C_\alpha H_{i+2}$
Hélice H-8	9-10	NH_i-NH_{i+1} , $-C_\beta H_{i-1}$, $-C_\alpha H_{i-1}$

Tableau 15

Cette technique présente l'avantage d'obtenir des informations structurales issues d'hydrogènes autres que les hydrogènes NH. Ainsi, l'examen qualitatif des effets nOe peut indiquer la présence d'une structure secondaire spécifique dans un β -peptide. Par exemple, l'analyse NOESY ou ROESY d'une hélice H-14 montrera une série continue d'effets nOe ($\text{NH}_i, \text{NH}_{i+1}$) relativement faibles, accompagnée par plusieurs effets nOe moyens de type ($\text{NH}_i, \text{NH}_{i+2}$), ($\text{C}_\beta\text{H}_i, \text{NH}_{i+2}$) et ($\text{C}_\beta\text{H}_i, \text{C}_\beta\text{H}_{i+3}$).

Nous allons voir en détail quelques exemples d'analyse par RMN NOESY et ROESY sur des β -peptides qui adoptent des structures secondaires en hélice.

- L'hélice-12 de l'hexamère du (1*R*,2*R*)-*trans*-ACPC **223**

Gellman *et coll.* ont réalisé des expériences de RMN 1D et 2D pour mener une analyse conformationnelle de l'hexamère du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACPC (Figure 62). Les résultats d'analyse du spectre ROESY ont rélévé la présence de corrélations spécifiques d'une hélice H-12⁴⁰ (Figure 63).

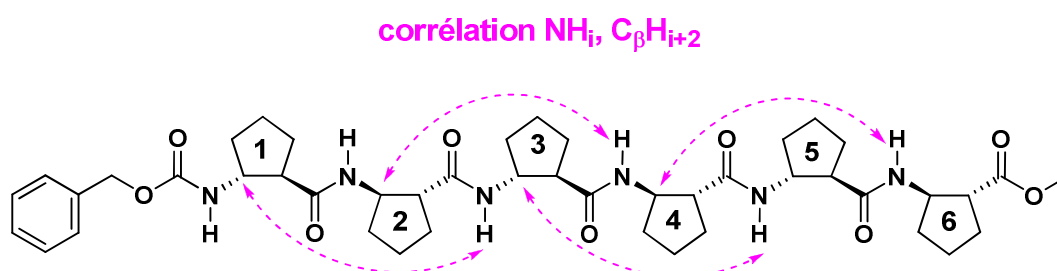


Figure 62 : hexapeptide **223**

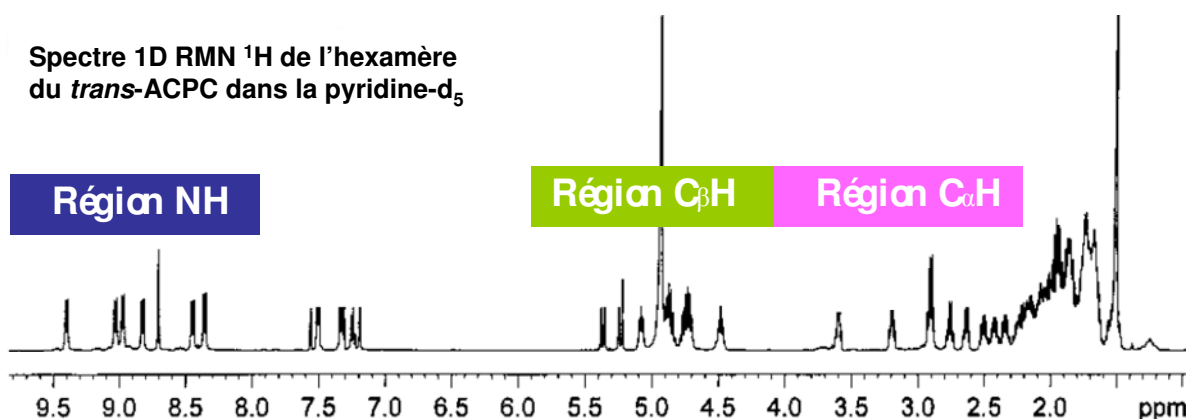


Figure 63 : spectre ^1H RMN 1D de l'hexapeptide du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACPC

L'agrandissement de la zone de corrélation NH/C β H du spectre ROESY met en évidence des points de corrélation entre des protons NH_i et C β H_{i+2}. Ces corrélations sont caractéristiques de l'hélice-12 et définissent la proximité spatiale de ces protons, pourtant éloignés dans la séquence linéaire d'agencement d'atomes par liaisons covalentes (Figure 64).

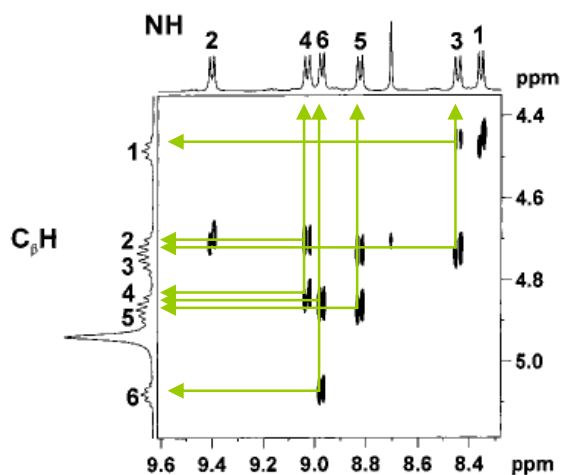


Figure 64

La découverte d'une nouvelle hélice a toujours été fondée sur une analyse conformationnelle par RMN NOESY ou ROESY. Donc, c'est grâce à cette technique spectroscopique que les hélices -8, -10, 10/12, -12, -14, etc. ont pu être mises en évidence.

Pour la détermination de structure secondaire, la RMN est en principe la plus puissante des méthodes spectroscopiques. Dans des cas favorables, cela peut offrir la même information structurale que la cristallographie aux rayons X. Cependant, chaque technique spectroscopique a sa propre échelle de temps. La RMN, elle, peut distinguer des espèces en équilibre conformationnelle seulement si elles ont des durées de vie dans la gamme des millisecondes. Cette lenteur est aussi une faiblesse parce qu'elle fournira une information qui sera une moyenne pondérée de toutes les structures présentes. Donc, l'interprétation des données RMN pour obtenir la conformation de peptides requière une certaine précaution.

b) Le dichroïsme circulaire

Un chromophore dans un environnement asymétrique absorbe de façon différente les composantes droite et gauche d'un faisceau de photons circulairement polarisé (Figure 65).

Au fur-et-à-mesure que la lumière avance à travers la solution, sa trajectoire se rapproche petit à petit d'une ellipse.

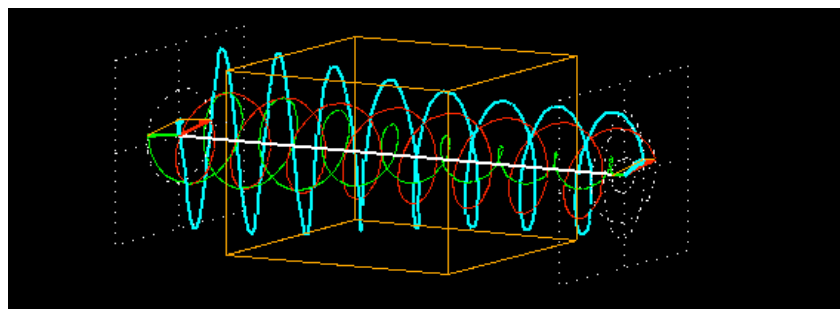


Figure 65

Les coefficients d'extinction molaires (ϵ) pour la lumière gauche et droite sont différents pour ces molécules chirales. Le spectre de dichroïsme circulaire (DC) correspond à la différence d'absorbance mesurée pour chaque longueur d'onde. Cette différence d'absorbance est appelée ellipticité molaire et elle est obtenue par la formule :

$$\theta = \Delta\epsilon \times C \times l \text{ (deg.cm}^2\text{)} \quad \begin{array}{l} \Delta\epsilon = \text{différence des coefficients d'extinction} \\ \text{(absorption dichroïque)} \\ C = \text{la concentration en mol/L} \\ l = \text{largeur de la cellule en cm} \end{array}$$

Pour comparer une série d'oligomères tout en se soustrayant de la concentration, l'ellipticité molaire est convertie en ellipticité par résidu. De ce fait, on dit que l'ellipticité est normalisée. On obtient l'ellipticité par résidu par la formule suivante :

$$[\theta] = (100 \times \theta) / C \times l \times n \text{ (deg.cm}^2\text{.dmol}^{-1}\text{)} \quad n = \text{nombre de résidus du peptide}$$

L'allure de l'ellipticité est liée à la conformation de la molécule (Figure 66a). Chacune des structures ordonnées (hélice, feuillet et coude) possède un macrodipôle spécifique, et le dichroïsme circulaire fournira des absorptions caractéristiques de la structure ordonnée présentant un macrodipôle (Figure 66b). Les protéines possédant plusieurs types de structures secondaires, le dichroïsme circulaire va fournir un spectre à partir duquel chaque structure secondaire sera quantifiée.

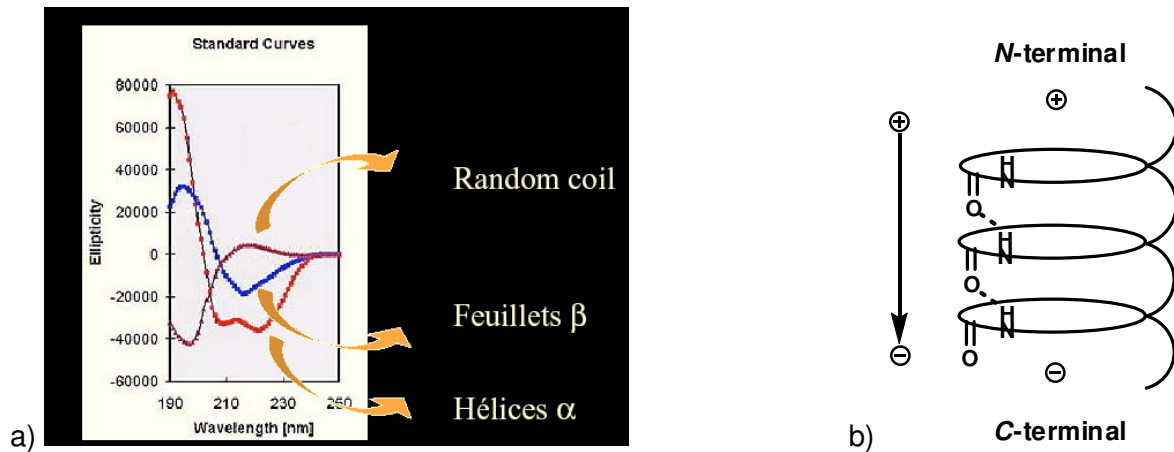


Figure 66 : a) ellipticité des protéines b) macrodipôle d'une hélice

Le phénomène physique du DC est une absorption UV qui se traduit par une transition électronique d'un état fondamental à un état excité. Selon la longueur d'onde d'absorption, cette transition peut-être $n \rightarrow \pi^*$ (290-320 nm) ou encore $\pi \rightarrow \pi^*$ (190-230 nm). La liaison peptidique est un chromophore qui absorbe dans l'UV lointain, et plus particulièrement entre 190-240 nanomètres. L'hélice α dans les protéines et les α -peptides, présente une ellipticité négative à 209 nm et 222 nm sur le spectre de dichroïsme circulaire (*cf.* figure 66).

Cette technique a l'avantage d'être très sensible puisqu'il est possible de travailler avec des solutions de peptides à des concentrations de l'ordre de 10^{-6} M.

Le dichroïsme circulaire a également trouvé sa place dans le domaine des β -peptides, et cette technique est devenue une méthode à part entière dans la détermination de structure secondaire. Seebach *et coll.* a été le premier à obtenir l'allure d'une courbe de DC d'un β -heptapeptide qui forme une hélice-14¹⁴⁷ (*cf.* figure 56). La figure 67 ci-dessous, montre le spectre DC de l'heptapeptide avec la superposition de 3 courbes pour 3 températures d'analyse différentes. La réalisation du DC à différentes températures permet de définir la stabilité thermique de la structure secondaire. Ici, le spectre DC apporte deux informations :

- l'allure de la courbe présente deux extrema, à savoir une ellipticité négative à 214 nm, suivie d'une ellipticité positive à 198 nm. Il y a ici un point de similitude avec l'hélice α , à savoir l'ellipticité négative proche de 220 nm (*cf.* figure 66a)

- la stabilité de l'hélice-14 de l'heptamère est confirmée à haute température puisque la courbe subit une faible variation en fonction de la température.

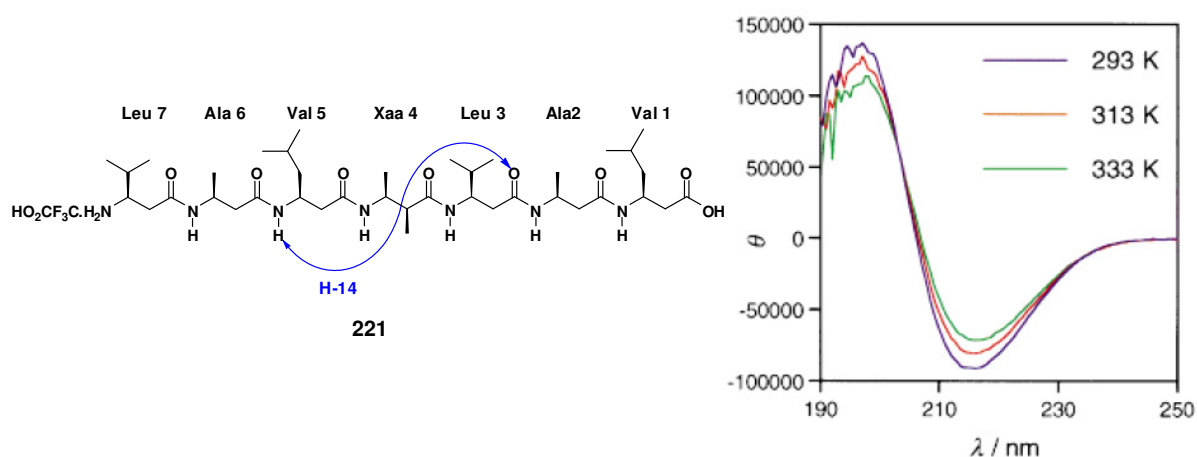


Figure 67

Gellman *et al.* ont réalisé une analyse par DC sur le dimère, le trimère, le tétramère et l'hexamère du $(1R,2R)$ -*trans*-ACPC⁴⁰ (cf. figure 36, p. 29). Les résultats montrent la présence d'une ellipticité avec des extrema à 222 nm et 207 nm pour l'hexamère **224**. Cela indique que la formation de l'hélice-12 était réellement prononcée à partir de l'hexamère (Figure 68).

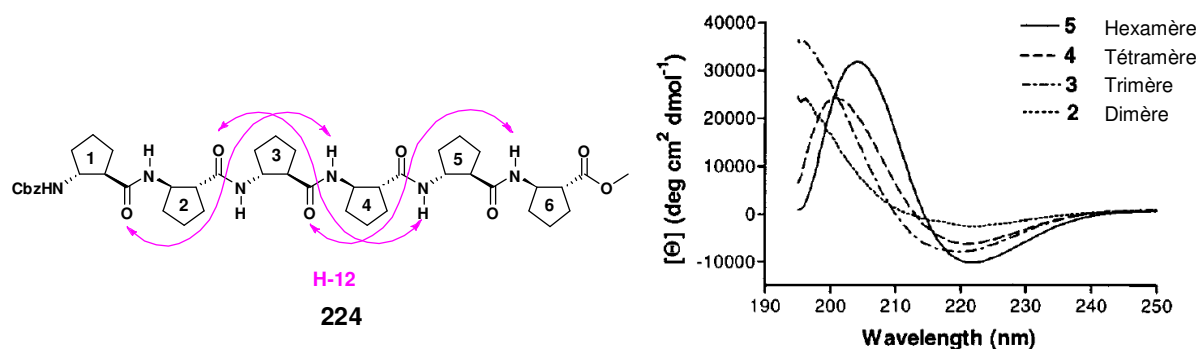


Figure 68

Ces résultats ont confirmé les conclusions de Gellman *et coll.* déjà établies par le biais de l'analyse des spectres de RMN et servent également de référence pour indiquer la présence de structuration en hélice H-12.

Le DC est une technique très sensible pour la détermination de structuration, et encore plus pour les structures en hélice. Par contre, des résultats récents basés sur des expériences et des calculs théoriques, ont montré que le spectre de dichroïsme circulaire

était la résultante pondérée de plusieurs structures en solution. Par conséquent, l'interprétation d'un DC en terme d'une seule structure ne serait pas possible¹⁴⁸.

c) Le dichroïsme circulaire vibrationnel

Le dichroïsme circulaire vibrationnel (VCD) est une technique complémentaire basée sur l'absorption d'ondes électromagnétiques infrarouges. Cette technique utilise des irradiations d'énergie plus faible que l'UV qui vont exciter les liaisons interatomiques et entraîner des élongations de liaisons ou bien des déformations d'angles.

Le principe est le même que celui décrit précédemment pour le DC. La molécule doit posséder un moment dipolaire; alors, les liaisons entrent en résonance par absorption des ondes, et il s'ensuit un spectre d'absorbance du composé analysé. Ce spectre sera caractéristique de la structure secondaire présente dans l'échantillon.

Cependant, cette technique reste peu utilisée dans la détermination de structure secondaire.

d) L'infrarouge

L'infrarouge (IR) est une technique d'analyse qui donne des informations sur la nature de la structuration d'un peptide ou d'une protéine. La bande d'absorption "amide I" correspondant à des vibrations d'élongation du carbonyle C=O est caractéristique d'une structure ordonnée. Par chaque type de structuration secondaire dans les protéines et les α -peptides, il existe une valeur d'absorption caractéristique de cette bande (Tableau 16).

Absorption (amide I)	Type de structure secondaire
1650 cm^{-1}	hélice α
1625, 1640 et 1670 cm^{-1}	feuillet β
1680 cm^{-1}	coude β
1640 cm^{-1}	structure désordonnée (amorphe)

Tableau 16

¹⁴⁸ a) Glättli A. ; Daura, X. ; Seebach, D. ; van Gunsteren, W. F. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, 124, 12972-12978, b) Daura X. ; Bakowies, D. ; Seebach, D. ; Fleischhauer, J. ; van Gunsteren, W. F. ; Krüger, P. *Eur. Biophys. J.* **2003**, 32, 662-670

e) Les rayons X

Les techniques conformationnelles décrites jusqu'ici ont été réalisées en solution. Les rayons X permettent de déterminer une structuration régulière à l'état solide. Il est raisonnable de penser qu'il y a une corrélation entre la structuration à l'état solide et celle à l'état liquide parce que la structuration est un phénomène interne, indépendant de la maille ou de la nature du solvant.

Les protéines cristallisent difficilement. Il en va de même pour les peptides y compris les β -peptides. Effectivement, seuls deux foldamères de β -peptides ont pu être cristallisés à ce jour : l'octapeptide du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACPC⁴⁰ et le tétrapeptide du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACHC³⁹ (Figure 70).

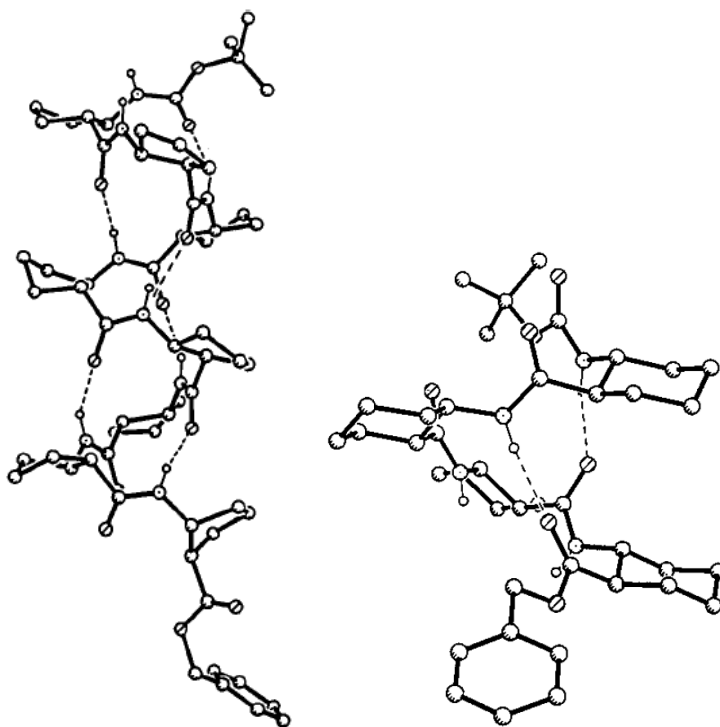


Figure 70 : à gauche l'octapeptide et à droite le tétrapeptide

La diffraction par rayons X de ces deux oligomères a révélé l'existence de mailles cristallines constituées d'oligomères structurés en hélice-12, structure identique à celle observée à l'état liquide.

f) La modélisation moléculaire

La modélisation moléculaire est un outil puissant utilisé pour déterminer des populations de conformations, et notamment la conformation de minimum global d'énergie. Elle peut être

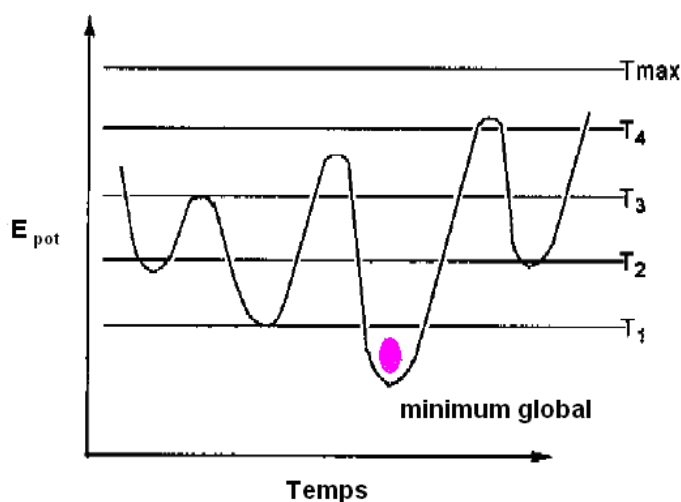
utilisée sans apport d'informations structurales externes, ou bien avec des informations qui conduisent à une restriction de la recherche de l'espace conformationnel.

Les contraintes peuvent être apportées par la RMN sous forme de distances interatomiques imposées entre certains protons, et de valeurs d'angles dièdres. Ces contraintes sont directement tirées des spectres ^1H NOESY, ROESY et RMN 1D.

Les méthodes de calcul de mécanique classique sont utilisées pour explorer l'espace conformationnel de grandes molécules (poids moléculaire élevé). Il existe trois méthodes de calcul pour mener une étude conformationnelle : la dynamique moléculaire, le recuit simulé et le Monte-Carlo.

1- La dynamique moléculaire basée sur la mécanique newtonienne va explorer l'espace conformationnel¹⁴⁹. Elle peut être exécutée par des calculs avec ou sans contraintes RMN. C'est une méthode de calcul rapide mais qui possède un inconvénient. Si l'énergie cinétique de la molécule est trop faible, elle ne pourra pas passer des états de transition conformationnels d'énergie élevée.

2 – Le recuit simulé est une technique de dynamique moléculaire qui permet de réaliser des calculs avec l'évolution de la température au cours du temps. Le système étudié, avec ou sans contraintes, est chauffé à haute température, puis, refroidi lentement pour conduire à un minimum. La répétition de ce processus devrait conduire inéluctablement au minimum global d'énergie de la molécule considérée (Figure 71).

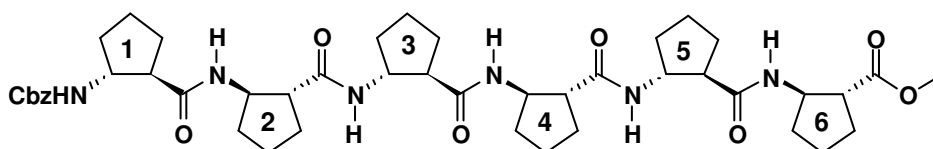


¹⁴⁹ Schwieters, C. D. ; Kuezewski, J. J. ; Tjandra, N. ; Clore, G. M. *J. Magn. Reson.* **2003**, 160, 65

Figure 71

3- La méthode Monte-Carlo va générer des conformations aléatoires à partir de la structure initiale. Chaque nouvelle conformation générée sera retenue comme nouvelle conformation de départ, si l'énergie potentielle de celle-ci est inférieure à la précédente. Par ce procédé, on s'affranchit directement de la barrière d'énergie potentielle pour accéder à la structure de minimum global.

Gellman *et coll.* ont utilisé le recuit simulé dans la détermination de conformations de minimum d'énergie potentielle pour l'hexamère **224**⁴⁰ (cf. figure 68). L'analyse après modélisation moléculaire (MD) a montré l'existence d'une hélice H-12 avec le minimum global d'énergie. La superposition des différents groupes de conformères a montré un parfait recouvrement de la partie centrale de la molécule, puis, une flexibilité accrue sur les parties terminales, non contraintes par des liaisons hydrogènes (Figure 72).



224

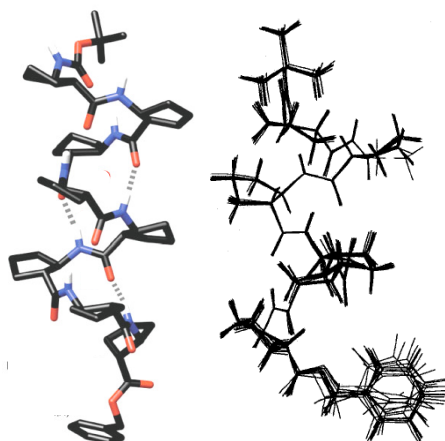


Figure 72

g) Conclusion

Nous avons présenté un bref résumé des approches employées dans la littérature pour élucider la structure tridimensionnelle de petits peptides.

Nous avons exploité certaines des méthodes décrites précédemment pour l'analyse conformationnelle de nos oligomères.

2) Analyse conformationnelle des oligomères du (–)-(1*R*,2*R*)-ACBC

a) Etudes par RMN

Nous avons entrepris une étude conformationnelle des oligomères du (–)-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACBC par RMN ^1H complète du tétramère (–)-**214**, de l'hexamère (–)-**217** et l'octamère (–)-**219**. Le dimère n'a pas fait l'objet d'études poussées puisqu'il est trop court pour avoir une structuration de type foldamère.

Nous avons commencé par la recherche d'un solvant deutéré de RMN capable de dissoudre les trois oligomères et également de fournir un spectre RMN 1D avec des signaux éclatés. En effet, il est nécessaire que les signaux des régions C_αH , C_βH et NH des résidus cyclobutaniques, soient totalement éclatés pour effectuer les analyses de RMN 2D a posteriori.

Le tableau 17 ci-dessous indique les solvants testés sur le tétra-, l'hexa- et l'octamère du (–)-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACBC **110**, en vue de réaliser les expériences de RMN ^1H .

Solvants deutérés	Dissolution	Allures spectre RMN
Acétonitrile (CD_3CN)	Non	-
Dichlorométhane (CD_2Cl_2)	Non	-
Chloroforme (CDCl_3)	Oui	Signaux non éclatés
Acétone ($(\text{CD}_3)_2\text{CO}$)	Non	-
Benzène (C_6D_6)	Non	-
Méthanol (CD_3OD)	Oui	Signaux non éclatés
Pyridine ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$)	Oui	Signaux éclatés

Tableau 17

La plupart des solvants n'ont pas dissous les oligomères (–)-**214**, (–)-**217** et (–)-**219**. à l'exception du chloroforme, du méthanol et de la pyridine deutérés. L'analyse des spectres de RMN ^1H pour chaque composé a montré que dans le chloroforme et dans le méthanol il y avait regroupement des multiplets dans les régions C_αH , C_βH et NH. Par contre, l'utilisation

de la pyridine-d₅ a montré un bon éclatement des signaux. Partant de ces résultats, nous avons choisi d'utiliser la pyridine-d₅ comme solvant pour les études par RMN.

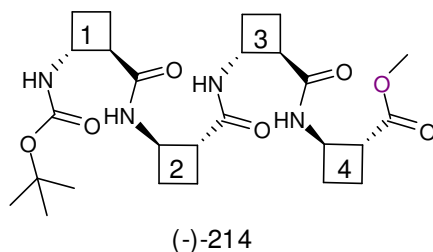
Il est important de définir au préalable la concentration de chaque oligomère dissous dans la pyridine-d₅, et plus précisément, il est nécessaire de se situer dans une gamme de concentration entre 8 mM et 15 mM^{40,42}. Si la concentration est inférieure, l'analyse perdrait en sensibilité. Par contre, si la concentration est supérieure à 15 mM, on risquerait de favoriser l'agrégation des molécules entre elles, et par conséquent, de modifier l'allure du spectre. Compte tenu de ces informations, nous avons préparé chaque échantillon des oligomères **(-)-214**, **(-)-217** et **(-)-219** dans la gamme de concentration requise.

1) Attribution des protons des oligomères

Dans un premier temps, il était nécessaire d'attribuer de façon univoque chaque signal des spectres de RMN ¹H et ¹³C, afin de pouvoir exploiter par la suite les informations des expériences de RMN 2D.

Cet objectif a été réalisé grâce à des expériences COSY, TOCSY, HSQC ¹H-¹³C, HMBC ¹H-¹³C, HMBC ¹H-¹⁵N effectuées sur chaque oligomère.

- Le tétramère **(-)-214**



La figure 73 représente le spectre de RMN du ¹H du tétramère **(-)-214**. Nous pouvons noter la séparation des signaux dans la région des protons d'amides (région NH), la région des H_β et la région des H_α. Ainsi, nous avons pu établir sans ambiguïté l'attribution de chaque signal (Tableau 18).

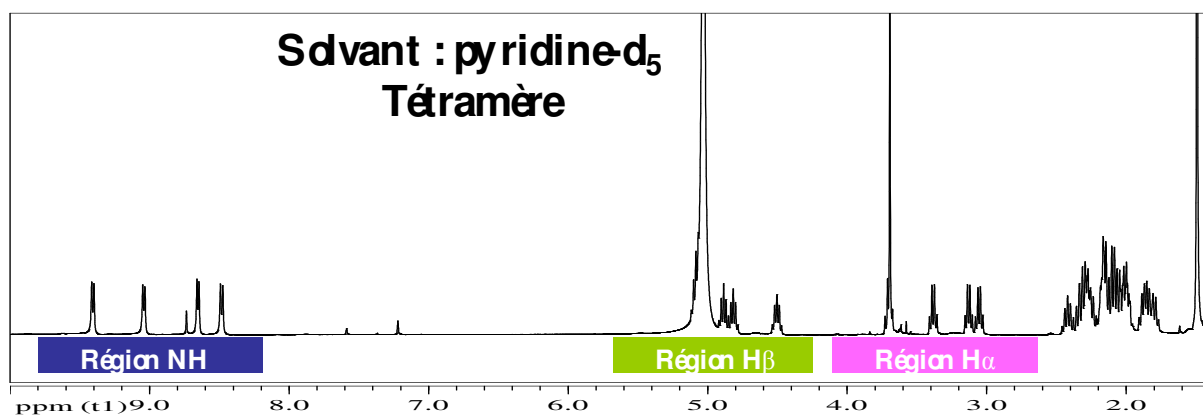
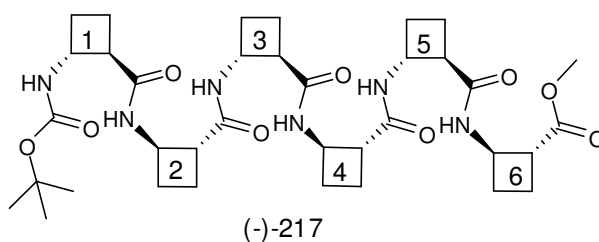


Figure 73

Résidu	NH	H _α	H _β
1	8,64	3,09	4,47
2	9,38	3,02	4,79
3	8,44	3,35	4,86
4	9,01	3,67	5,01

Tableau 18

- L'hexamère (-)-217



Le spectre de RMN du ¹H de l'hexamère (-)-217 est représenté sur la figure 74. Bien que ce spectre soit plus complexe que celui du térapeptide (-)-214, nous avons pu attribuer sans difficulté tous les signaux caractéristiques de l'hexamère (Tableau 19).

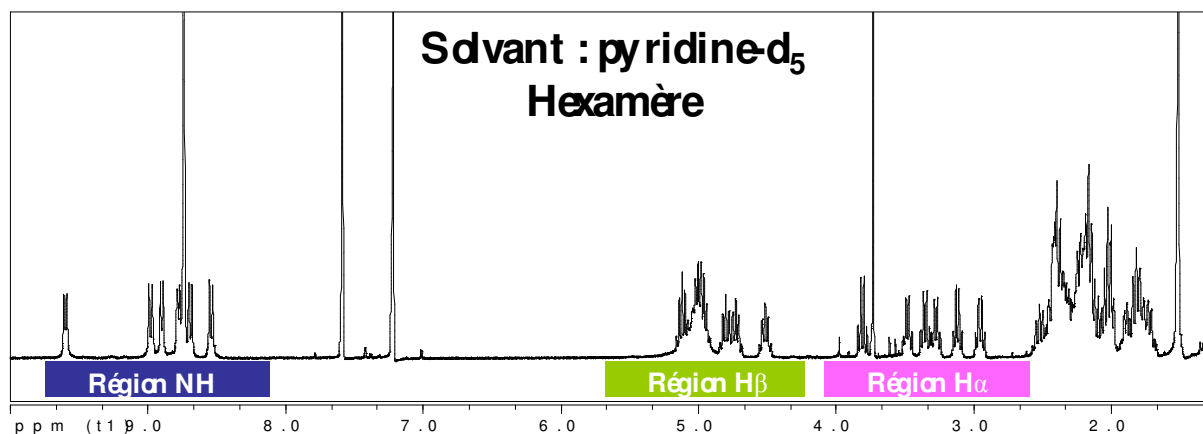
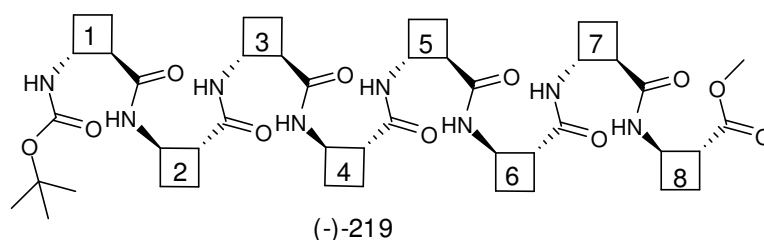


Figure 74

Résidu	NH	H _α	H _β
1	8,80	3,11	4,51
2	9,62	2,94	4,72
3	8,54	3,27	4,80
4	8,98	3,35	4,96
5	8,69	3,48	5,02
6	8,90	3,81	5,12

Tableau 19

- L'octamère (-)-**219**



Le spectre de RMN ¹H de l'octamère (-)-**219** est présenté sur la Figure 75. Avec l'élongation de la chaîne peptidique, on observe quelques recouvrements de multiplets. Néanmoins, les régions des C_αH et des NH sont suffisamment éclatées pour mener une étude structurale ultérieure. La région des C_βH souffre d'un recouvrement de deux signaux, mais cela ne nous a pas empêchés d'attribuer tous les signaux (Tableau 20).

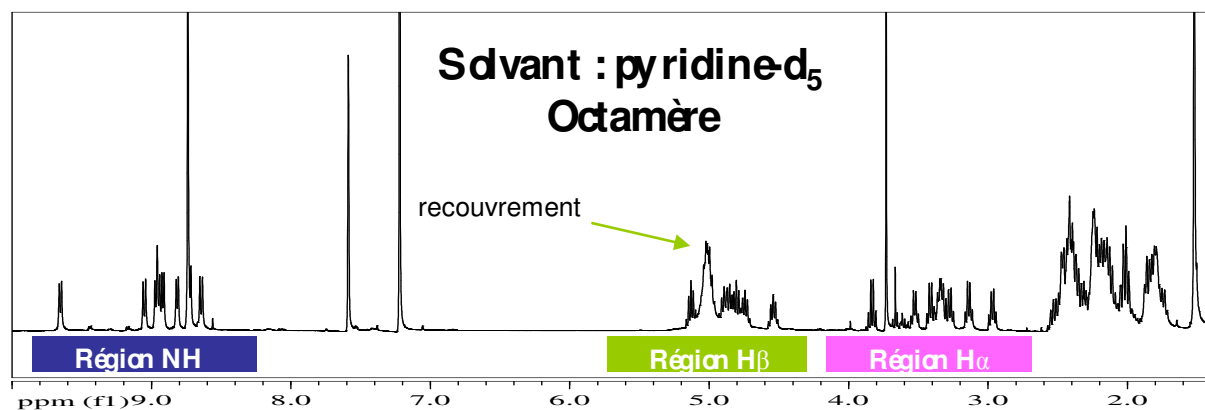


Figure 75

Résidu	NH	H _α	H _β
1	8,82	3,14	4,54
2	9,66	2,97	4,74
3	8,65	3,27	4,81
4	8,95	3,34	4,85
5	8,97	3,36	4,89
6	8,90	3,41	4,98
7	8,73	3,53	5,03
8	8,91	3,83	5,13

Tableau 20

2) Influence de la température sur les hydrogènes NH

Avec une attribution complète des signaux, nous avons pu entamer l'analyse conformationnelle proprement dite. Nous avons commencé par l'analyse des effets de température sur les déplacements chimiques des hydrogènes NH.

Pour cette étude, nous avons travaillé sur l'hexamère **(-)-217** et l'octamère **(-)-219**. Une solution de chacun dans la pyridine- d_5 a été chauffée à 20, 30, 40, 50, 60 et 70 °C, et pour chaque température, nous avons enregistré le spectre de RMN 1H à une dimension.

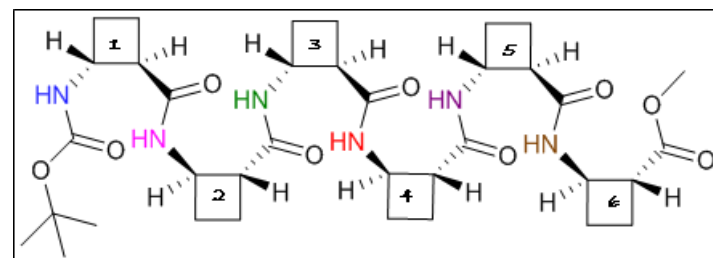
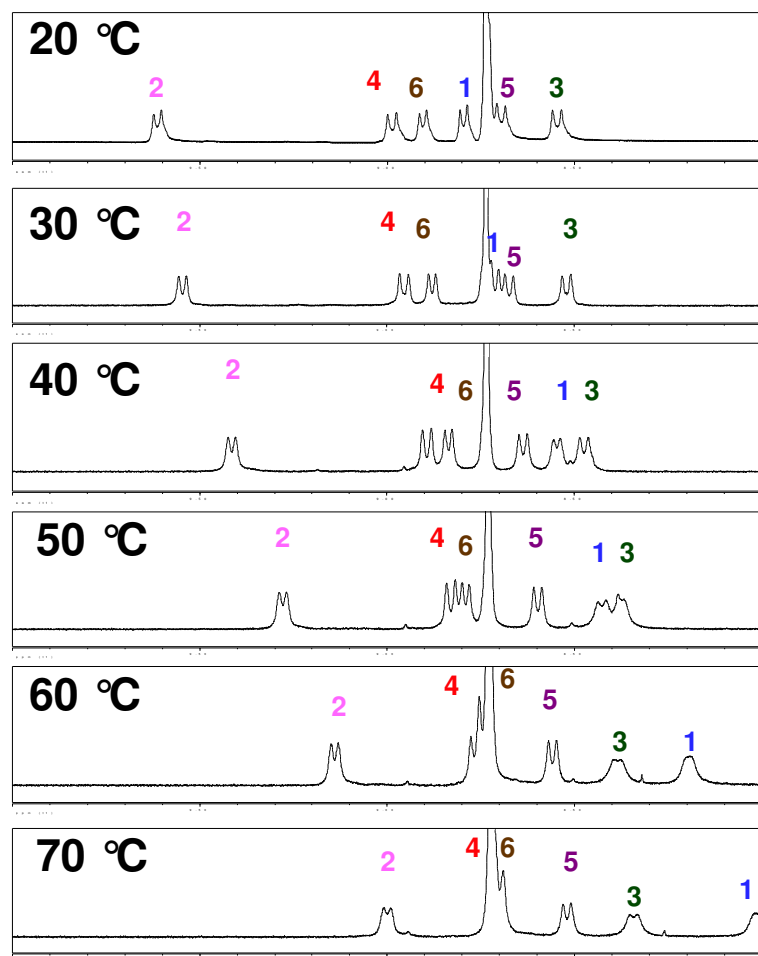
- L'hexamère **(-)-217**

Après avoir calibré tous les spectres de l'hexamère, nous en avons agrandi la région des hydrogènes d'amide. Ensuite, nous les avons alignés verticalement et ceci dans un ordre croissant en fonction de la température (Figure 76a). Nous voyons une linéarité des déplacements chimiques pour chaque proton. Les hydrogènes NH-1 et NH-2 sont fortement déplacés avec l'augmentation de la température alors que les autres hydrogènes NH ne subissent pas ou peu l'influence.

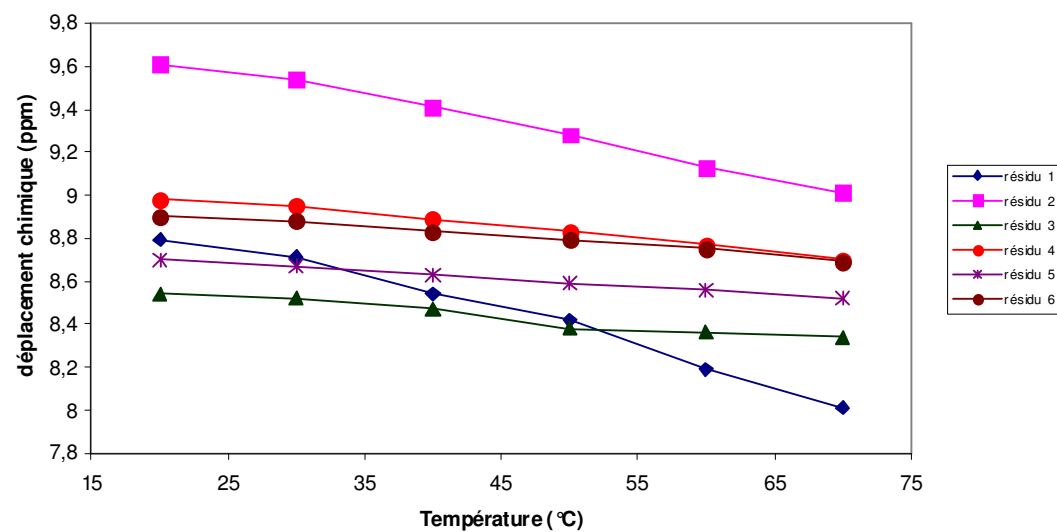
Nous avons traduit ce phénomène dans le graphique ci-dessous (Figure 76b). Cela nous indique qu'il existe des liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes dans l'hexamère, à partir du résidu 3 jusqu'au résidu 6.

Cette observation n'est pas compatible avec une structuration de **(-)-217** en hélice-10 ou hélice-14, puisque celles-ci impliquent des liaisons hydrogènes intramoléculaires incluant les résidus 1 et 2 de la partie *N*-terminale.

a)



Déplacement chimique des NH avec T



b)

Figure 76

a) Analyse des constantes de couplages du dièdre N-H-C_β-H

Un bon moyen de voir si la structure a été modifiée avec la température serait de vérifier les valeurs de constantes de couplage entre les protons NH et les hydrogènes adjacents en C_β. Il y a un couplage entre ces deux protons, ce qui fournit un doublet. Nous avons sélectionné deux doublets caractéristiques de notre molécule, afin d'étudier l'évolution de leur constante de couplage entre 20 et 70 °C (Tableau 21).

Température	J _{N-H-C_β-H} (Hz) - Résidu 2	J _{N-H-C_β-H} (Hz) - Résidu 5
20	8	9
30	8	9
40	8	10
50	8	9
60	7	9
70	6	9

Tableau 21

Le proton NH du résidu 2 qui est fortement déblindé, voit sa constante de couplage diminuer, ce qui entraîne une variation de l'angle dièdre associé au couple de protons. Le proton NH du résidu 5, quant à lui, faiblement influencé, voit sa constante de couplage rester fixe au cours de l'expérience.

Cette expérience montre la stabilité des angles dièdres NH-C_βH des résidus internes et C-terminal, ainsi que la flexibilité de la partie N-terminale.

b) Dispersion des protons NH

La dispersion des déplacements chimiques causée par l'environnement elliptique est une preuve qualitative de structure secondaire. Si cette dispersion reste constante avec la température, la structuration est validée. Dans les structures non-ordonnées (aléatoires), une grande différence de déplacement chimique entre deux protons NH ne serait pas observée.

Dans notre cas, les déplacements chimiques restent éloignés entre protons NH. Cela conforte les résultats observés jusqu'à présent.

c) Coefficient de température

Le coefficient de température (C.T.) permet de définir la présence de liaisons hydrogènes au sein de la molécule étudiée. Il est déterminé par le rapport de la variation des déplacements chimiques des protons NH sur la variation de température, soit $C.T. = (\delta_{\text{final}} - \delta_{\text{initial}}) / (\Delta T)$.

Nous avons donc calculé les C.T. de chaque proton NH entre 20 et 70 °C (Tableau 22).

Résidu T (°C)	1 (ppm)	2 (ppm)	3 (ppm)	4 (ppm)	5 (ppm)	6 (ppm)
20	8,79	9,61	8,54	8,98	8,70	8,90
30	8,71	9,54	8,52	8,95	8,67	8,88
40	8,54	9,41	8,47	8,89	8,63	8,83
50	8,42	9,28	8,37	8,83	8,59	8,79
60	8,19	9,13	8,37	8,77	8,56	8,75
70	8,01	9,01	8,34	8,70	8,52	8,69
C.T. (ppb/°C)	- 15,6	- 12	- 4	- 5,6	- 3,6	- 4,2

Tableau 22

Les coefficients de température déterminés sur une gamme de 50 °C sont tous négatifs. Ceci est en accord avec les résultats observés pour la résonance des NH dans les α -peptides et les protéines. Il est communément admis dans la littérature que les valeurs supérieures à - 6 ppb/°C révèlent la présence de liaisons hydrogènes intramoléculaires. Nous avons donc dans notre cas, la présence de liaisons hydrogènes pour les résidus 3, 4, 5 et 6, comme nous l'avions pressenti en début d'analyse.

Avec l'ensemble des résultats engrangés au cours des différentes expériences sur les protons NH, c'est-à-dire l'inertie des constantes de couplage, la conservation de la dispersion de déplacements chimiques et des coefficients de température inférieures aux limites imposées, nous pouvons dire qu'il existe des liaisons hydrogènes intramoléculaires fortes du cœur de l'hexamère jusqu'à la partie C-terminale. Cela nous donne à penser que, s'il y a une structuration secondaire en hélice, ce ne sera pas une hélice-10 ni une hélice-14, parce qu'il n'y a pas de liaison hydrogène intramoléculaire impliquant les NH des résidus 1 et 2. En revanche, une structuration en hélice-8 ou hélice-12 serait possible (Figure 77).

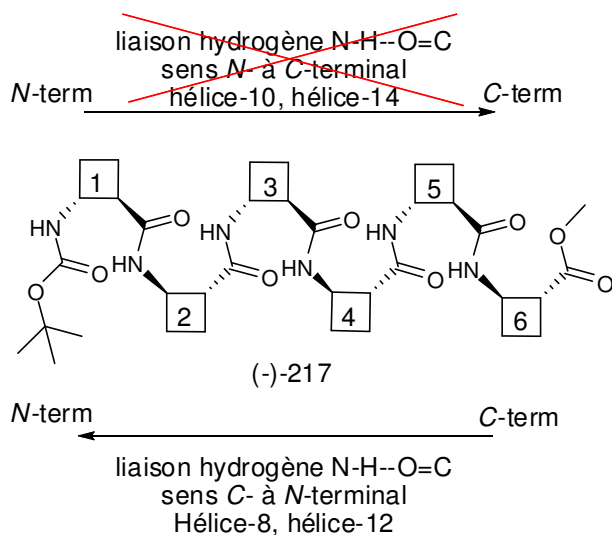


Figure 77

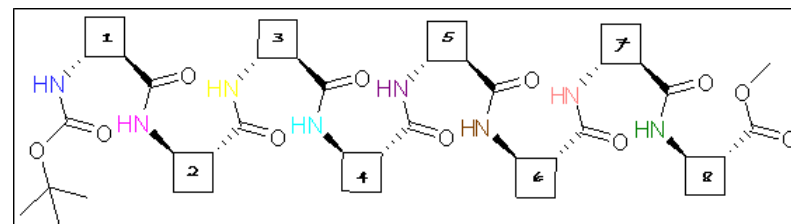
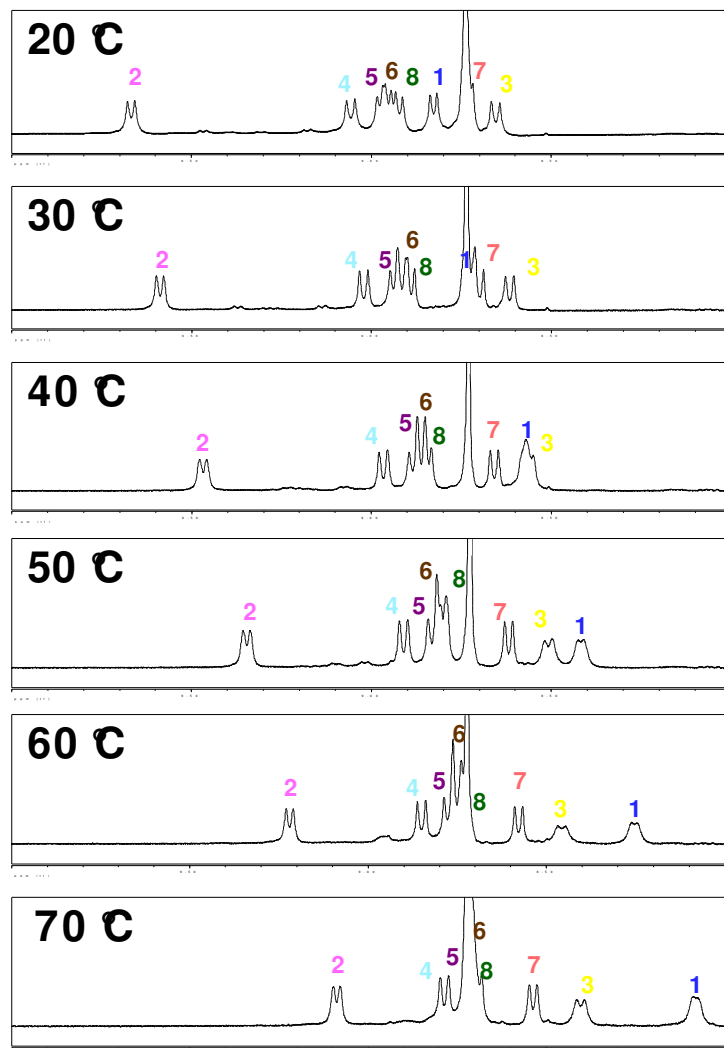
- L'octamère **(-)-219**

Nous avons réalisé les expériences de température sur l'octamère **(-)-219** afin de corroborer les observations obtenues avec l'hexamère **(-)-217**. Le spectre de RMN ^1H à chaque température a été calibré, puis, aligné sur la région des hydrogènes NH (Figure 78a).

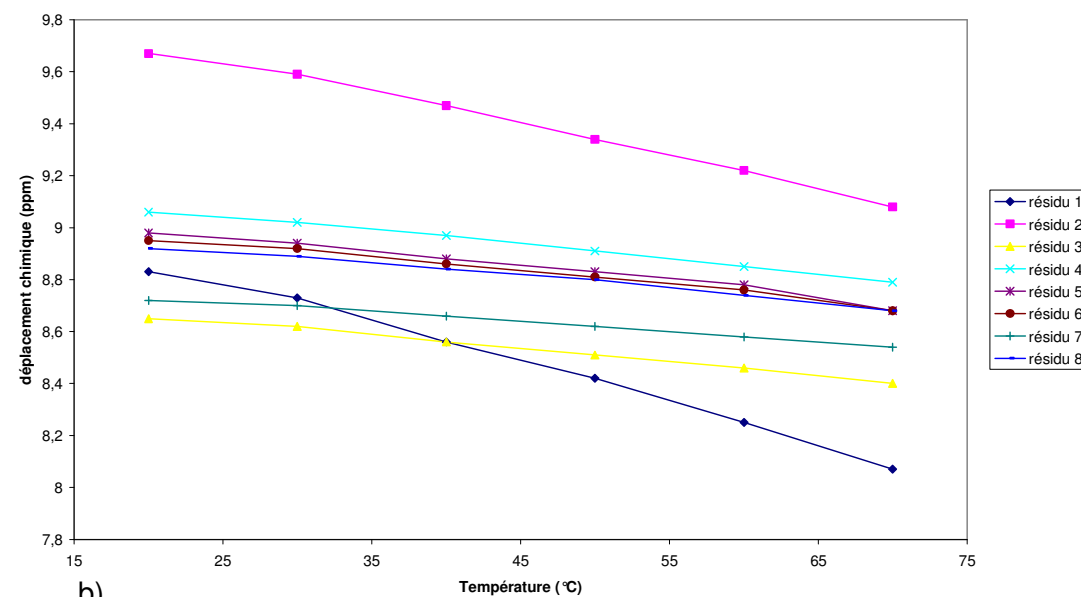
Comme précédemment, nous avons observé un déplacement des protons amidiques des résidus 1 et 2 avec la température, alors que les autres protons sont faiblement influencés. Ceci est confirmé par le graphique (Figure 78b), où le proton NH du résidu 1 est déplacé de 0,76 ppm entre 20 et 70 °C.

Nous avons également examiné les constantes de couplages du dièdre $\text{N-H-C}_\beta\text{-H}$ pour chaque proton amidique, ainsi que la dispersion des déplacements chimiques et leur coefficient de température.

a)



Déplacement chimique des NH avec T



b)

Figure 78

a) Analyse des constantes de couplages du dièdre N-H-C_β-H

Puisque la molécule est plus grande, nous avons pris trois points de comparaison pour cette étude. Le tableau 23 montre l'évolution des constantes de couplages entre 20 et 70 °C.

Température	J _{N-H-C_β-H} (Hz) - Résidu 2	J _{N-H-C_β-H} (Hz) - Résidu 3	J _{N-H-C_β-H} (Hz) - Résidu 4
20	8	9	9
30	8	10	9
40	8	10	-
50	8	9	9
60	8	9	10
70	7	9	9

Tableau 23

Comme pour l'hexamère **(-)-217**, nous voyons que la constante de couplage du résidu 2 dans la partie N-terminale diminue légèrement. Les deux autres protons NH subissent aussi une légère fluctuation. Ces résultats montrent une bonne stabilité du système dans son ensemble. Les autres expériences nous donneront des informations plus conséquentes.

b) Dispersion des protons NH

Par comparaison avec l'hexamère **(-)-217**, nous observons toujours la dispersion des signaux au cours du gradient de température. L'octamère présenterait également un arrangement structuré du squelette peptidique.

c) Coefficient de température

Les coefficients de température ont été calculés sur l'octamère **(-)-219** pour confirmer ou infirmer les résultats obtenus avec l'hexamère **(-)-217**. Si les résultats s'avèrent positifs, nous avons alors un système structuré à partir de l'hexamère.

Nous avons donc déterminé les C.T. de chaque proton NH entre 20 à 70 °C (Tableau 24).

Résidu T (°C)	1 (ppm)	2 (ppm)	3 (ppm)	4 (ppm)	5 (ppm)	6 (ppm)	7 (ppm)	8 (ppm)
20	8,83	9,67	8,65	9,06	8,98	8,95	8,72	8,92
30	8,73	9,59	8,62	9,02	8,94	8,92	8,70	8,89
40	8,56	9,47	8,56	8,97	8,88	8,86	8,66	8,84
50	8,42	9,34	8,51	8,91	8,83	8,81	8,62	8,80
60	8,25	9,22	8,46	8,85	8,78	8,76	8,58	8,74
70	8,07	9,08	8,40	8,79	8,68	8,68	8,54	8,68
C.T. (ppb/°C)	- 15,2	- 11,8	- 5	- 5,4	- 6	- 5,4	- 3,6	- 4,8

Tableau 24

Le coefficient de température des protons d'amide des résidus 1 et 2 est inférieur à - 6 ppb/°C et le coefficient de température des autres protons est compris entre - 3,6 et - 6 ppb/°C. Il y a donc une forte empreinte de liaisons hydrogènes intramoléculaires dans l'octamère **(-)-219**, et nous en déduisons qu'il se structure de la même façon que l'hexamère **(-)-217**.

3) Etude de l'échange chimique H/D

Jusqu'à présent, nous avons mis en évidence un réseau de liaisons hydrogènes intramoléculaires dans l'hexamère **(-)-217** et dans l'octamère **(-)-219**. Une autre preuve de cette affirmation pourrait être apportée par une étude de l'échange chimique des protons d'amides avec une source protique deutérée. Certains auteurs utilisent le méthanol deutéré (CD₃OD) comme source de deutérium, puis, laisse évoluer le système jusqu'à obtenir une demi-extinction des signaux des amides.

En début de chapitre, nous avons mis en avant que le méthanol solubilisait les oligomères, mais il était un mauvais solvant pour l'éclatement les signaux. Nous avons donc décidé d'étudier l'échange chimique en introduisant une quantité infime d'eau lourde (D₂O). Un volume de 20 µL de D₂O a été introduit dans un tube RMN contenant l'hexamère **(-)-217** (8 mM) dans la pyridine-d₅ (5 mL). Ensuite, nous avons laissé évoluer le système jusqu'à obtenir les temps de demi-extinction de chaque proton d'amide (Tableau 25).

Résidu (proton NH)	Temps de demi-extinction (heure)
1	6
2	24
3	30
4	30
5	30
6	22

Tableau 25

D'après le tableau, nous voyons que le proton du résidu 1 atteint la demi-extinction au bout de 6 heures. Ensuite, nous avons le proton des résidus 2 et 6 qui suivent avec 24 heures. Et enfin, les résidus 3, 4 et 5 arrivent à la demi-extinction après 30 heures. La figure 79 qui représente l'alignement des spectres RMN ^1H de la région des NH, offre un aperçu de la disparition progressive des protons d'amides.

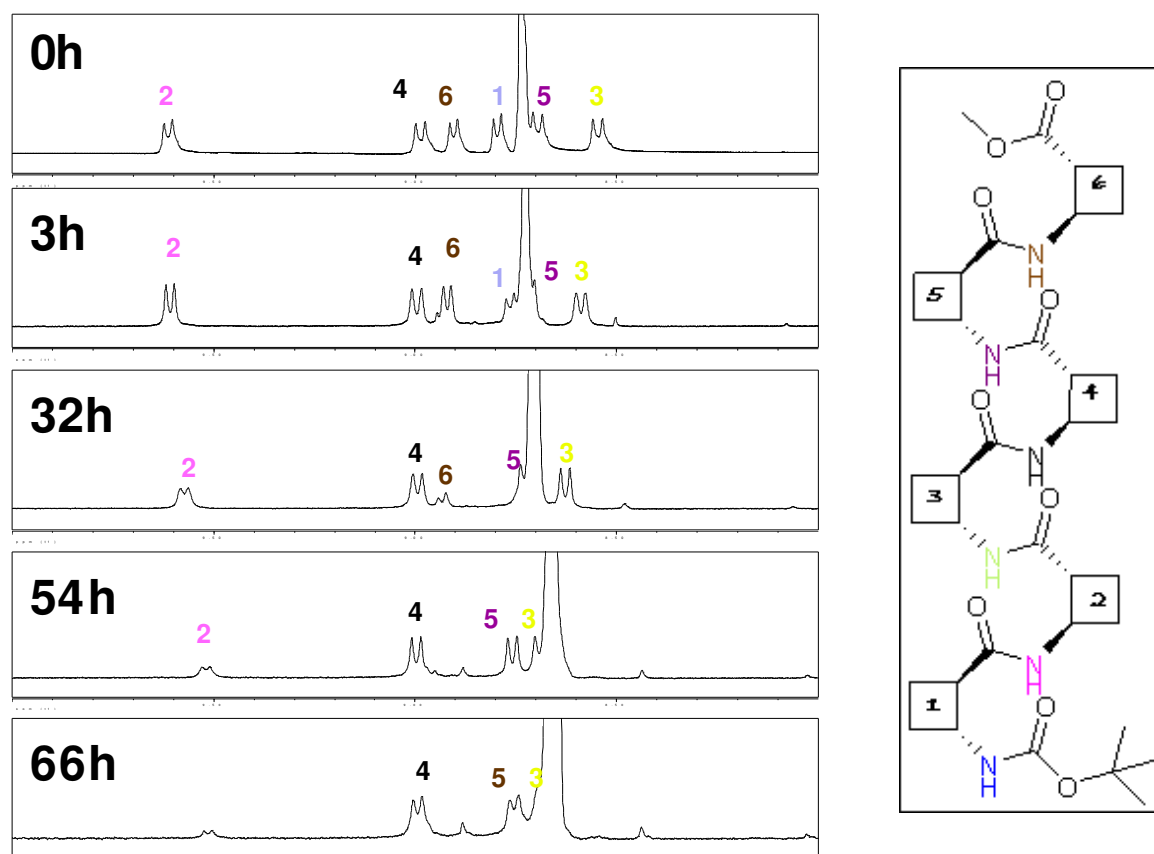


Figure 79

La disparition du proton NH du résidu 6 s'explique certainement par la flexibilité de la partie C-terminale. C'est vraisemblablement la force des liaisons hydrogène intramoléculaires qui ralentit fortement l'échange chimique des NH des résidus internes 3, 4 et 5.

Ces résultats vont dans le même sens que ceux observés dans l'étude avec la température, tant sur l'hexamère que sur l'octamère. Il est clair que ces deux oligomères possèdent des liaisons hydrogène intramoléculaires. De plus, la nature des liaisons hydrogène laisse imaginer la présence d'une structure secondaire de type hélice. Cette hypothèse d'un arrangement possible en hélice est renforcée par le fait que la conformation locale du *trans*-aminoacide cyclobutanique est bloquée en position synclinale. Cette conformation favorise la formation d'hélices (Figure 80).

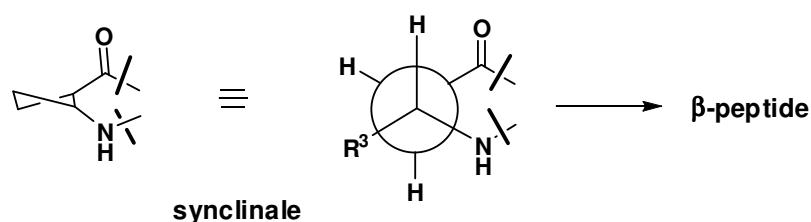


Figure 80

4) RMN à deux dimensions

La RMN à deux dimensions apporte des informations concernant l'agencement spatial des atomes d'hydrogènes dans les peptides.

Le tétramère **(-)-214**, l'hexamère **(-)-217** et l'octamère **(-)-219** ont fait l'objet d'une étude par NOESY et/ou par ROESY. Pour éviter tout artéfact additionnel lié à la présence d'oxygène, les échantillons ont été dégazés à l'argon pendant 1 h. Nous avons également décidé de préparer des échantillons d'oligomères avec des concentrations de 10 mM suffisantes pour l'analyse mais évitant l'agrégation des molécules.

Avant de pouvoir réaliser les expériences de RMN NOESY et ROESY, il est impératif de trouver les bonnes conditions d'acquisition des données. En effet, dans ce type d'expériences, il est nécessaire de définir le temps de mélange approprié pour l'obtention d'un spectre résolu avec les corrélations dipolaires.

Le temps de mélange définit le temps nécessaire pour que les spins atomiques puissent s'apercevoir dans l'espace provoquant alors un transfert d'aimantation (transfert de cohérence) de manière à pouvoir obtenir une corrélation de ces spins. Si le temps de mélange est mal défini, deux phénomènes peuvent alors se produire :

- le temps est trop court, alors les spins n'ont pas le temps de se voir et il n'y a pas de corrélation dipolaire.
- le temps est trop long; il peut alors y avoir un phénomène de diffusion de spin qui va engendrer une erreur quantitative et qualitative sur les tâches de corrélation.

a) Détermination du temps de mélange

Nous avons déterminé le temps de mélange sur l'hexamère **(-)-217**. Ainsi, l'échantillon contenant l'hexamère a été soumis à des expériences NOESY avec différents temps de

mélange. Dans la littérature, les études de couplage dipolaire sont menées avec des temps de mélange allant de 100 à 500 ms. Nous avons donc fixé ces temps à 100, 200, 300, 400, 500 ms respectivement.

A partir de chaque spectre, nous avons défini une tâche de corrélation de référence qui correspond au couplage de deux protons de distance connue (protons géminaux ou vicinaux), et une autre tâche de corrélation correspondant, elle, au couplage de deux protons de distance inconnue (Figure 81).

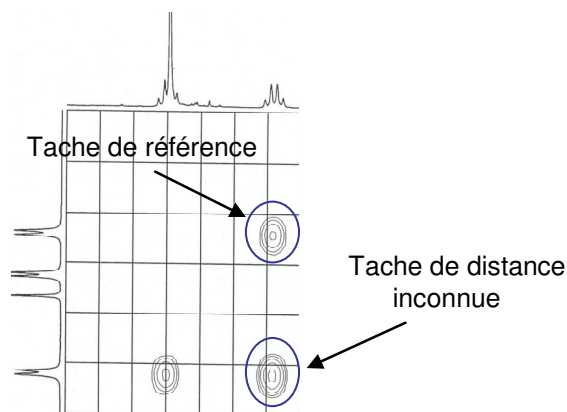


Figure 81

Ensuite, après intégration des volumes, il suffit de faire le rapport des volumes des deux tâches pour chaque temps de mélange, afin d'établir une courbe d'intensité en fonction du temps de mélange.

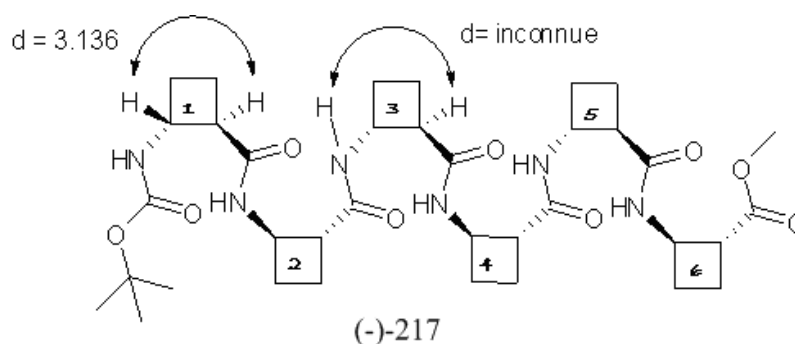
Formule pour le calcul de l'intensité :

$$I_{ij} = a_{ij}/a_{ref}$$

où I_{ij} : intensité de la tâche de corrélation j pour un temps de mélange donné
 a_j : aire de la tâche de corrélation du couple de protons de distance inconnue
 a_{ref} : aire de la tâche de corrélation du couple de protons de référence

Avec cette courbe d'intensité, il est facile de pouvoir déterminer le temps de mélange adéquat pour réaliser nos expériences NOESY et ROESY.

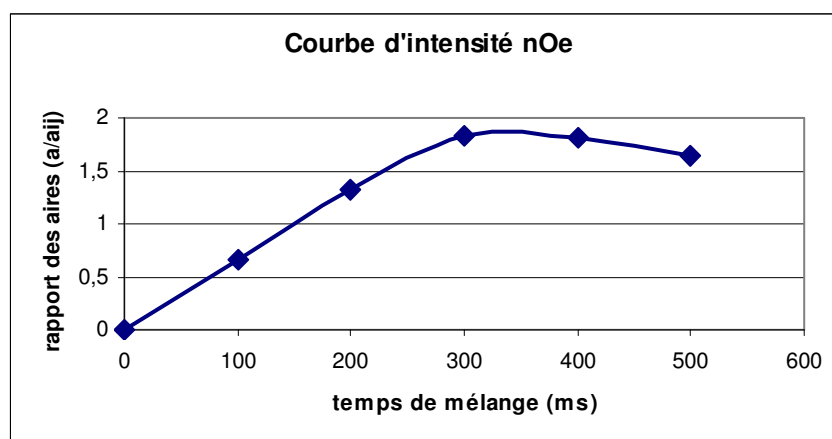
Nous avons donc choisi le couple de protons vicinaux ($C_\beta H_1-C_\alpha H_1$) du résidu 1 comme couple de référence, avec une distance internucléaire de 3,136 Å. Le second couple de protons choisi était le couple ($NH_3-C_\alpha H_3$). Le rapport des volumes pour chaque temps de mélange est indiqué dans le tableau 26 ci-dessous :



Temps de mélange (ms)	I (NH ₃ -C _α H ₃)
0	0
100	0,6615
200	1,3223
300	1,8352
400	1,3644
500	1,6637

Tableau 26

Grâce au tableau 26, nous avons obtenu le graphique qui représente l'allure de la courbe d'intensité nOe en fonction du temps de mélange (Graphique 1).



Graphique 1

L'allure de la courbe d'intensité montre une partie linéaire croissante sur les faibles temps de mélanges (100 et 200 ms). Ensuite, elle atteint un maximum à 300 ms et décroît pour des temps de mélange supérieurs (400 et 500 ms).

Lorsque nous avons observé les spectres NOESY obtenus avec différents temps de mélange, nous bien remarqué qu'avec 100 et 200 ms, la résolution était médiocre et tous les signaux n'apparaissaient pas. Par contre, à 300 ms, nous avons une bonne résolution

spectrale. Et enfin, avec 400 et 500 ms, nous avons observé une diminution sensible de la résolution mais les spectres étaient cependant exploitables.

Avec cette étude, nous avons observé qu'avec un temps de mélange égal à 300 ms, il y a un maximum d'intensité des tâches de corrélations. Le résultat de ces expériences nous a permis par la suite d'identifier la disposition spatiale de chacun des oligomères.

b) Analyse des résultats obtenus par la RMN à 2 dimensions

- Tétramère (-)-214

Lors du dépouillement du spectre NOESY, nous avons recensé deux classes de corrélations dipolaires. Une première classe qui montre les corrélations dipolaires identiques aux corrélations COSY et TOCSY (scalaires), puis, une seconde classe qui représente les corrélations dipolaires à moyenne et longue distance, indiquées sur la Figure 82.

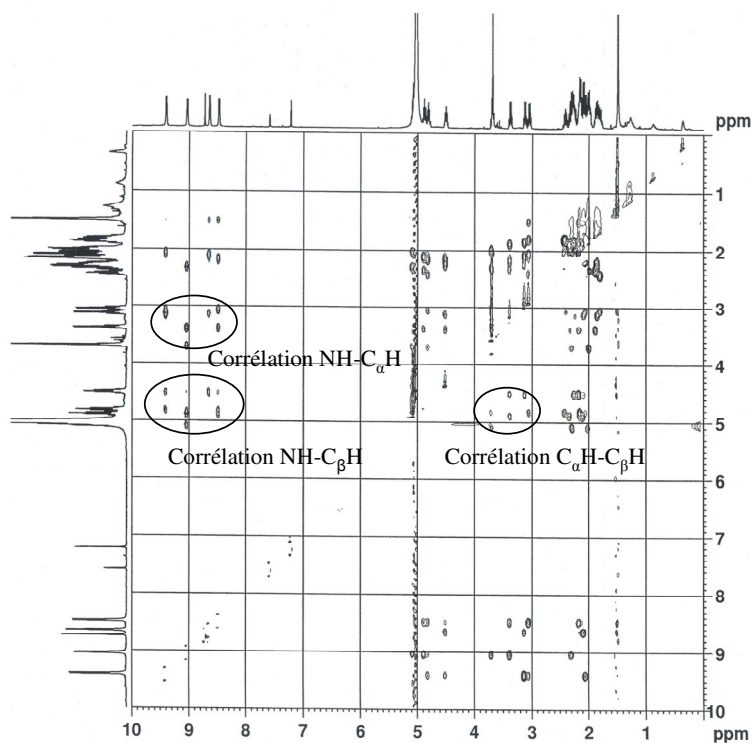


Figure 82

Ces corrélations sont recensées en 3 groupes de corrélations que nous avons représentées schématiquement sur la Figure 83, ci-dessous :

- $\text{NH}_i - \text{C}_\alpha\text{H}_i$, $\text{NH}_i - \text{C}_\alpha\text{H}_{i-1}$
- $\text{C}_\beta\text{H}_i - \text{NH}_{i+2}$
- $\text{C}_\beta\text{H}_i - \text{C}_\alpha\text{H}_{i+2}$

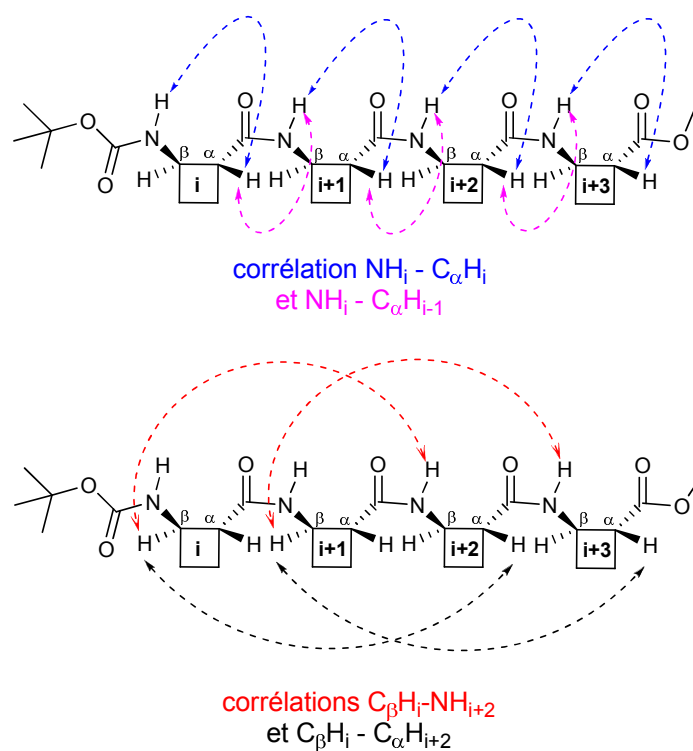
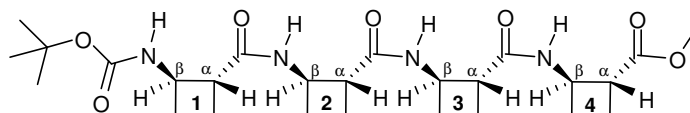


Figure 83

Ensuite, nous avons répertorié les différentes tâches dans le tableau 27. Chaque tâche est associée à une intensité nOe intimement liée à la distance qui sépare un couple de proton.



Résidu	Atomes-H	Résidu	Atomes-H	Intensité nOe	Type hélice-12
1	NH	1	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Forte	
1	$\text{C}_\beta \text{H}$	3	NH	Faible	X
1	$\text{C}_\beta \text{H}$	3	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Faible	X
2	NH	2	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Forte	
2	NH	1	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Forte	
2	$\text{C}_\beta \text{H}$	4	NH	Faible	X
2	$\text{C}_\beta \text{H}$	4	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Faible	X
3	NH	3	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Forte	
3	NH	2	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Forte	
4	NH	4	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Forte	
4	NH	3	$\text{C}_\alpha \text{H}$	Forte	

Tableau 27

La figure 84 présente la zone de corrélation des $\text{NH}-\text{C}_\alpha \text{H}$. Les corrélations $\text{NH}_i - \text{C}_\alpha \text{H}_i$ résultent d'un couplage dipolaire de proximité entre le proton de l'amide du résidu i et le $\text{C}_\alpha \text{H}$ du même

résidu. Les corrélations $\text{NH}_i\text{-C}_\alpha\text{H}_{i-1}$ sont également de forte intensité, ce qui implique une proximité spatiale, avec un angle diédre C-C(O)-N-H optimal.

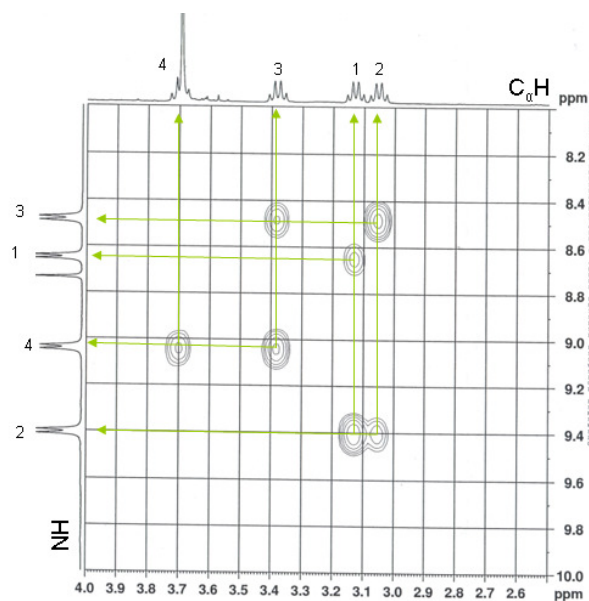


Figure 84

Dans la zone de corrélation des $\text{C}_\beta\text{H-NH}$, nous observons les couplages $\text{C}_\beta\text{H}_i\text{-NH}_i$ intra-résidu, ainsi que deux corrélations $\text{C}_\beta\text{H}_i\text{-NH}_{i+2}$ et une corrélation $\text{C}_\beta\text{H}_i\text{-NH}_{i+3}$ qui sont caractéristiques des hélices-12 (Figure 85).

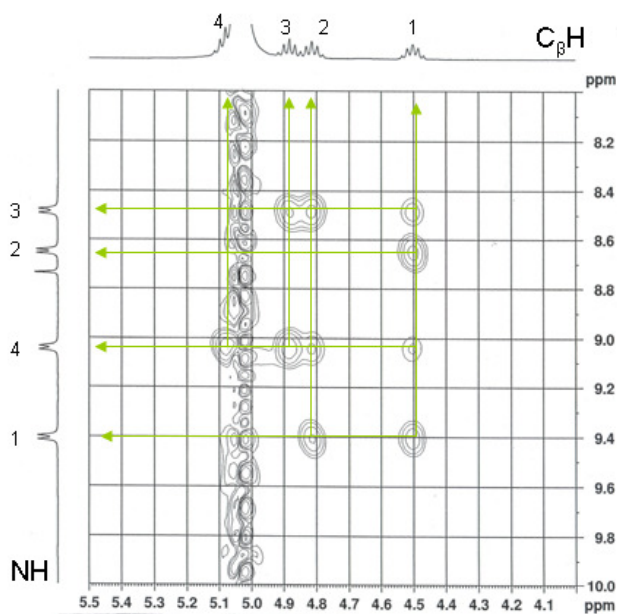


Figure 85

L'intensité de ces taches reste néanmoins assez faible, par rapport aux intensités des corrélations $\text{C}_\beta\text{H}_i\text{-NH}_i$.

Enfin, la zone de corrélation de $C_\beta H-C_\alpha H$ montre des corrélations intra-résidus et deux corrélations $C_\beta H_i-C_\alpha H_{i+2}$ caractéristiques de l'hélice-12 (Figure 86).

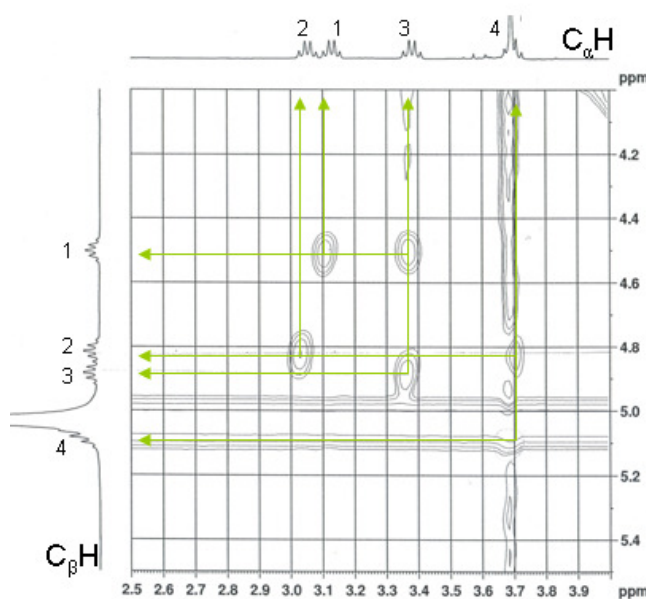


Figure 86

Les résultats obtenus sur le tétramère montrent clairement la présence de taches de corrélation caractéristiques d'une hélice-12, c'est-à-dire, des corrélations $C_\beta H_i-NH_{i+2}$, $C_\beta H_i-NH_{i+3}$, $C_\beta H_i-C_\alpha H_{i+2}$. Ces taches sont de faible intensité, ce qui laisse supposer que nous avons un début de structuration en hélice-12. L'augmentation du nombre de résidu sur la chaîne peptidique devrait encore plus affiner cette hélice.

- Hexamère (–)-217

Comme précédemment, nous avons isolé les différentes régions du spectre NOESY de l'hexamère (–)-217 (Figure 87).

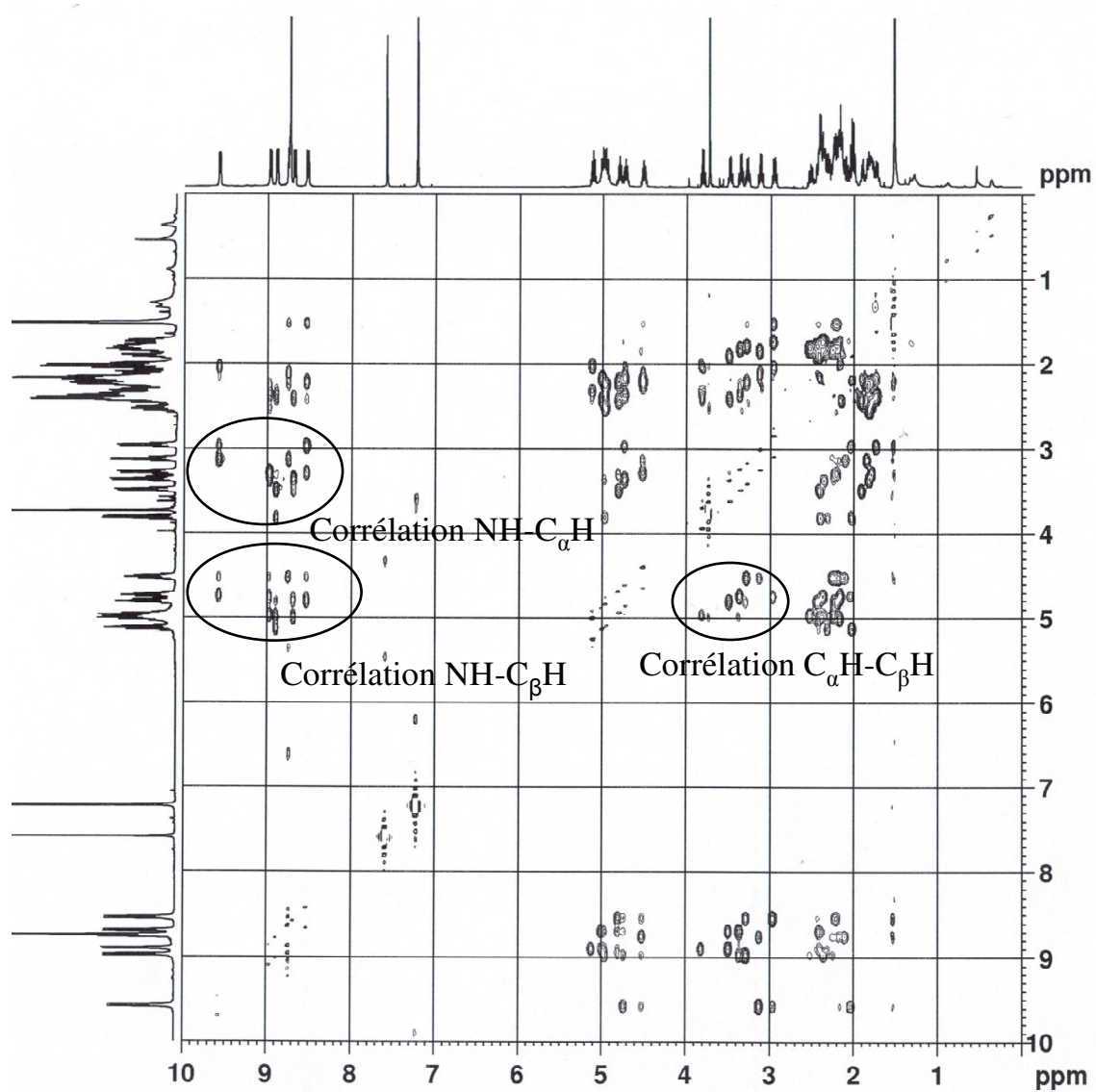
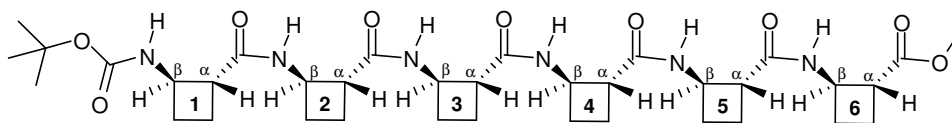


Figure 87

Ensuite, nous avons classé les différentes taches de corrélations de type $C_{\beta}H_i - NH_{i+2}$ et $C_{\beta}H_i - C_{\alpha}H_{i+2}$ (Tableau 28).



Résidu	Atomes-H	Résidu	Atomes-H	Intensité nOe	Type hélice-12
1	NH	1	$C_{\alpha}H$	Forte	
1	$C_{\beta}H$	3	NH	Moyenne	X
1	$C_{\beta}H$	3	$C_{\alpha}H$	Moyenne	X
1	$C_{\beta}H$	4	NH	Faible	X
2	NH	2	$C_{\alpha}H$	Forte	
2	NH	1	$C_{\alpha}H$	Forte	
2	$C_{\beta}H$	4	NH	Moyenne	X
2	$C_{\beta}H$	4	$C_{\alpha}H$	Moyenne	X
3	NH	3	$C_{\alpha}H$	Forte	
3	NH	2	$C_{\alpha}H$	Forte	
3	$C_{\beta}H$	5	NH	Moyenne	X
3	$C_{\beta}H$	5	$C_{\alpha}H$	Moyenne	X
3	$C_{\beta}H$	6	NH	Faible	X
4	NH	4	$C_{\alpha}H$	Forte	
4	NH	3	$C_{\alpha}H$	Forte	
4	$C_{\beta}H$	6	NH	Moyenne	X
4	$C_{\beta}H$	6	$C_{\alpha}H$	Moyenne	X
5	NH	5	$C_{\alpha}H$	Forte	
5	NH	4	$C_{\alpha}H$	Forte	
6	NH	6	$C_{\alpha}H$	Forte	
6	NH	5	$C_{\alpha}H$	Forte	

Tableau 28

L'analyse de chaque zone montre bien la présence de toutes les taches de corrélation caractéristiques de l'hélice-12. Dans la zone des $C_{\beta}H-NH$, nous avons un maximum de quatre corrélations de type $C_{\beta}H_i - NH_{i+2}$ et deux corrélations de type $C_{\beta}H_i - NH_{i+3}$ (Figure 88).

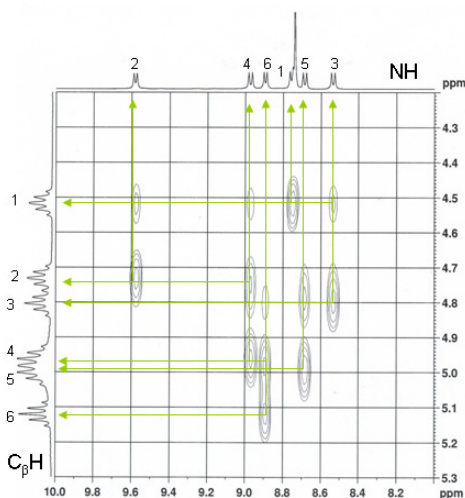


Figure 88

Dans la zone des $C_\beta H-C_\alpha H$, nous avons encore une fois le maximum de corrélations possible en $C_\beta H_i-C_\alpha H_{i+2}$ (Figure 89).

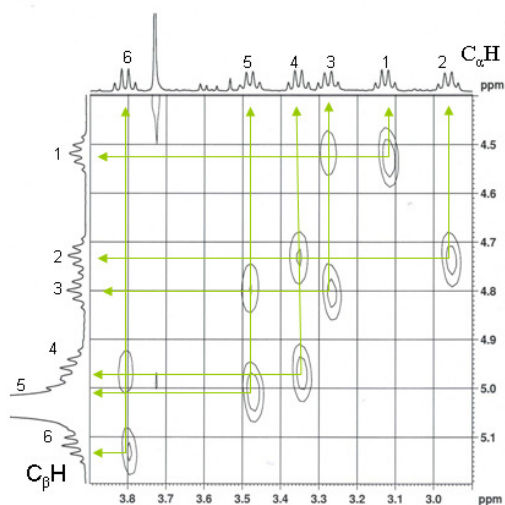


Figure 89

Comme nous l'avions prédit, l'allongement de la chaîne peptidique a renforcé la structuration en hélice-12. Nous avons noté une augmentation de l'intensité des taches de corrélation spécifiques à cette hélice, et nous avons vu des corrélations à longue distance de type $C_\beta H_i-C_\alpha H_{i+3}$ qui confortent ce modèle.

- Octamère (–)-219

En dernier lieu, nous avons réalisé les expériences ROESY sur l'octamère (Figure 90). Si nos hypothèses s'avéraient être justes, nous devions obtenir des caractéristiques identiques à celles que nous avons observées précédemment sur l'hexamère (–)-217.

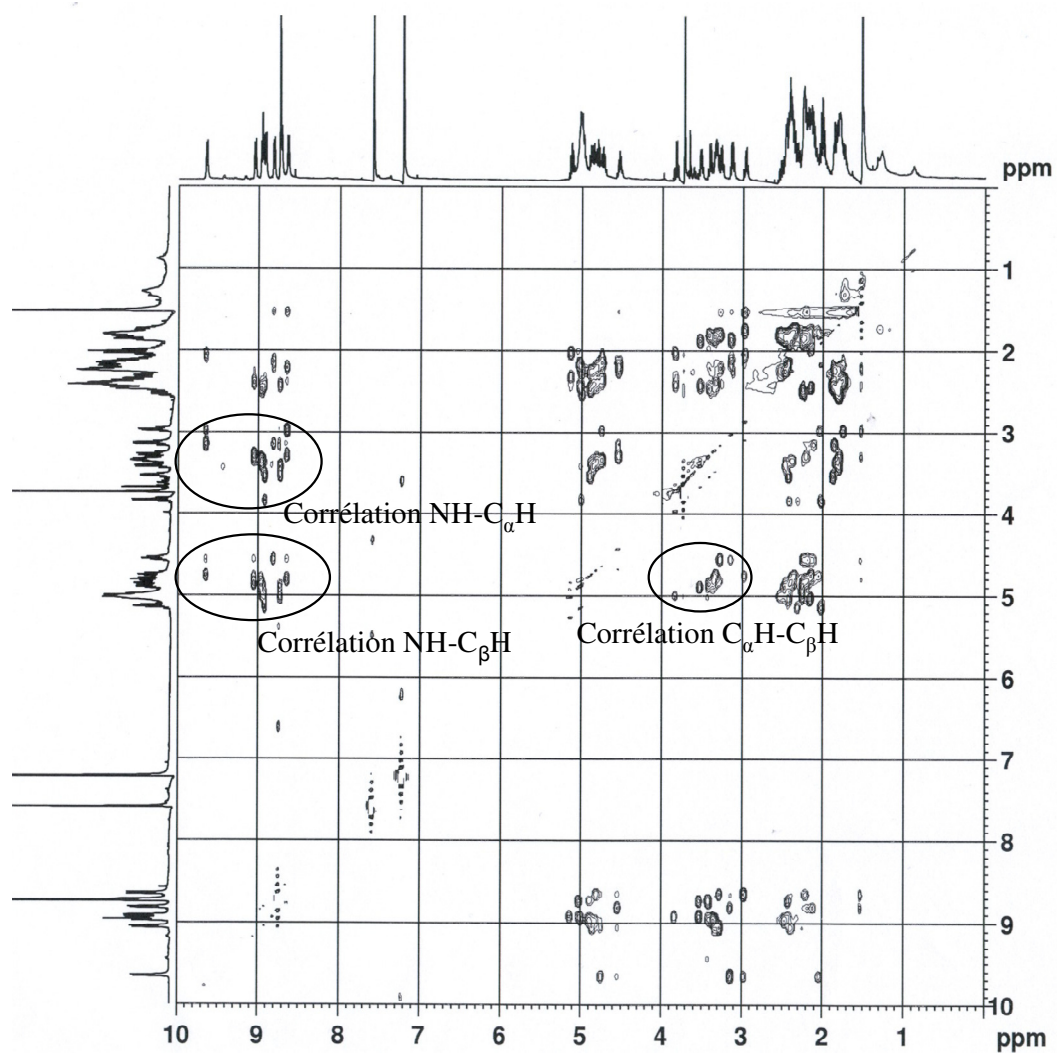
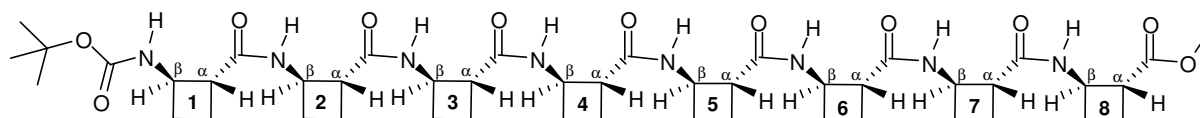


Figure 90

L'allongement de la chaîne peptidique a entraîné le chevauchement de certains multiplets. Malgré la complexité des spectres, il est tout de même possible de visualiser les corrélations spécifiques à l'hélice-12. Le tableau 29 ci-dessous, décrit les corrélations que nous avons pu extraire du spectre.



Résidu	Atomes-H	Résidu	H-atomes	NOE	Type hélice-12
1	NH	1	C $_{\alpha}$ H	Forte	
1	C $_{\beta}$ H	3	NH	Moyenne	X
1	C $_{\beta}$ H	3	C $_{\alpha}$ H	Moyenne	X
1	C $_{\beta}$ H	4	NH	Faible	X
2	NH	2	C $_{\alpha}$ H	Forte	
2	NH	1	C $_{\alpha}$ H	Forte	
2	C $_{\beta}$ H	4	NH	Moyenne	X
2	C $_{\beta}$ H	4	C $_{\alpha}$ H	Moyenne	X
3	NH	3	C $_{\alpha}$ H	Forte	
3	NH	2	C $_{\alpha}$ H	Forte	
3	C $_{\beta}$ H	5	NH	Moyenne	X
3	C $_{\beta}$ H	5	C $_{\alpha}$ H	Moyenne	X
4	NH	4	C $_{\alpha}$ H	Forte	
4	NH	3	C $_{\alpha}$ H	Forte	
4	C $_{\beta}$ H	6	NH	Moyenne	X
4	C $_{\beta}$ H	6	C $_{\alpha}$ H	Moyenne	X
5	NH	5	C $_{\alpha}$ H	Forte	
5	NH	4	C $_{\alpha}$ H	Forte	
5	C $_{\beta}$ H	7	NH	Moyenne	X
5	C $_{\beta}$ H	7	C $_{\alpha}$ H	Moyenne	X
6	NH	6	C $_{\alpha}$ H	Forte	
6	NH	5	C $_{\alpha}$ H	Forte	
6	C $_{\beta}$ H	8	NH	Moyenne	X
6	C $_{\beta}$ H	8	C $_{\alpha}$ H	Moyenne	X
7	NH	7	C $_{\alpha}$ H	Forte	
7	NH	6	C $_{\alpha}$ H	Forte	
8	NH	8	C $_{\alpha}$ H	Forte	
8	NH	7	C $_{\alpha}$ H	Forte	

Tableau 29

De nouveau, nous avons pu identifier les tâches relatives à l'hélice-12, tant dans la zone des C $_{\beta}$ H-NH (Figure 91a), que dans la zone des C $_{\beta}$ H-C $_{\alpha}$ H (Figure 91b).

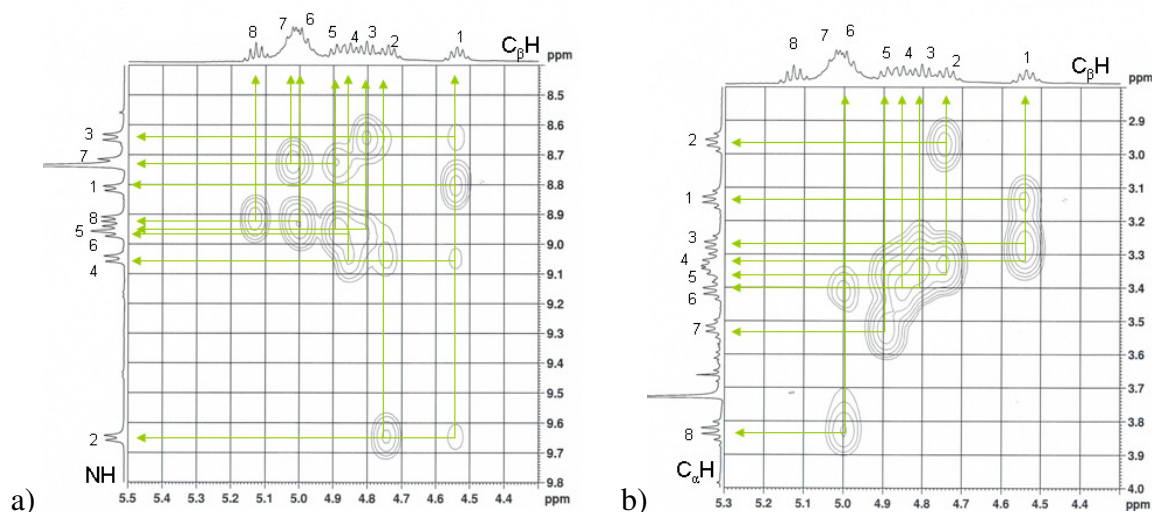


Figure 91

Comme nous l'avions pressenti, l'octamère (–)-**219** reproduit le même schéma de corrélation que l'hexamère (–)-**217**.

En résumé, nous avons des oligomères constitués de résidus (–)-(1*R*,2*R*)-*trans*-ACBC, lesquels à l'échelle locale, adoptent une conformation synclinale imposée et bloquée. Cela laissait fortement prévoir la formation d'une structure secondaire en hélice.

Les études par RMN 1D, utilisant le gradient de température et l'échange isotopique, nous ont donné la conviction d'une structuration par le biais de liaisons hydrogène intramoléculaires très fortes. De plus, ces liaisons hydrogène suivaient un profil directionnel particulier de sorte que nous pouvions éliminer certaines structures en hélice comme l'hélice-10 et l'hélice-14.

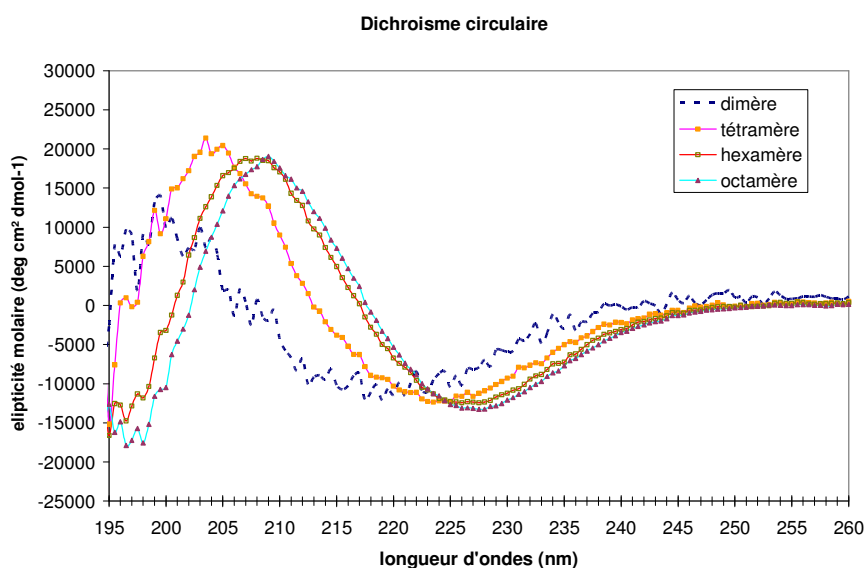
Les expériences de RMN à 2 dimensions de type NOESY et ROESY nous ont permis de définir avec précision la nature de cette structure en hélice. Dans notre cas, les corrélations relevées pour tétramère (–)-**214** jusqu'à l'octamère (–)-**219** nous ont menés à une structure en hélice-12, avec une structuration forte dès l'hexamère.

Pour valider notre modèle, nous avons réalisé une étude par dichroïsme circulaire.

b) Etude par dichroïsme circulaire

Pour réaliser cette expérience, nous avons utilisé un polarimètre à dichroïsme circulaire. Afin de vérifier l'hélicité de nos oligomères, nous avons travaillé avec le dimère (–)-**209**, le tétramère (–)-**214** et l'hexamère (–)-**217** et l'octamère (–)-**219**. De plus, le dimère servira de référence car avec deux résidus, il n'y a pas de structuration possible.

Les échantillons ont été préparés à partir de masses importantes pour éviter les risques d'incertitude. Ensuite, par un jeu de dilution, nous avons préparé des échantillons de chaque oligomère avec une concentration fixée à 0,2 mM dans le méthanol. Enfin, 250 μ L de chaque échantillon a été analysé pour fournir un spectre de DC caractéristique. Le graphique ci-dessous montre la superposition des courbes pour chaque oligomère pour une température d'analyse de 20 °C (Graphique 2).



Entre 260 et 195 nm, nous voyons que l'allure de la courbe du dimère (**(-)-209**) est semblable à celle obtenue pour des α -peptides amorphes (*cf.* figure 66). La courbe du tétramère présente une toute autre allure. En effet, on observe un pic d'ellipticité molaire négative à 223,5 nm et un autre positif à 203,5 nm. L'hexamère (**(-)-217**) et l'octamère (**(-)-219**) montrent le même comportement accompagné d'un déplacement des extrema d'absorption vers la droite et une augmentation de l'ellipticité. Ainsi, l'hexamère possède deux extrema à 227 et 208 nm et l'octamère, quant à lui, à 227,5 et 209 nm.

Une première constatation nous indique que nous sommes en présence d'une structuration en hélice, puisque nous avons une bande d'absorption négative vers 220 nm. Effectivement, cette bande négative est caractéristique des hélices α . Une seconde constatation montre l'existence d'une hélice dès le tétramère avec la première bande négative à 223,5 nm. Une troisième constatation nous informe sur la structuration complète de l'hélice en solution à partir de l'hexamère. En effet, la courbe de l'octamère se superpose quasiment à celle de l'hexamère. Le dernier point, et non des moindres, nous permet de dire que nous sommes

en présence d'une hélice-12, par comparaison de notre graphique avec celui publié par Appella *et al.*⁴⁰ Effectivement, ces auteurs ont décrit la formation d'une hélice-12 avec des oligomères du *trans*-ACPC (Figure 68)

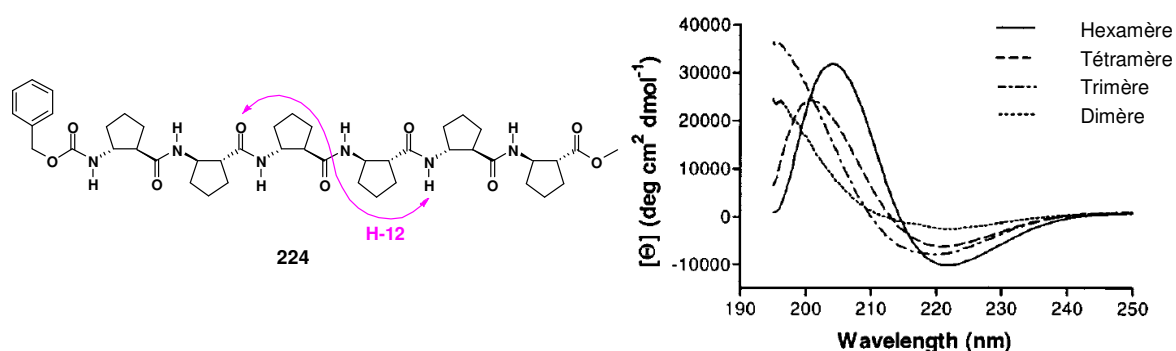
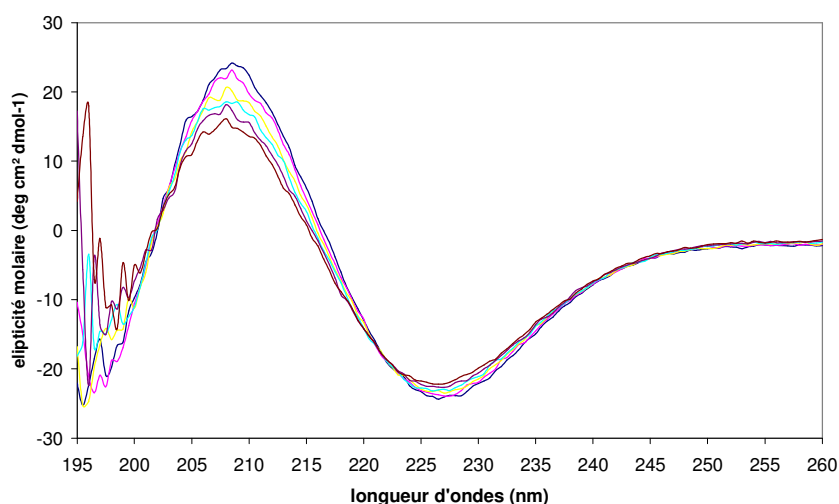


Figure 68

Notre spectre de DC présente la même allure que celui correspondant au composé **224**. Seules les valeurs des extrema sont légèrement différentes. En outre, les auteurs se sont arrêtés à l'hexamère dans leur analyse par DC.

Ensuite, nous avons réalisé une étude de la stabilité de l'octamère (–)-**219**. L'échantillon a été placé dans une enceinte thermostatée, puis, nous avons lancé des expériences par palier de 10 °C entre 5 et 55 °C (graphique 3).

dénaturation de l'octamère



Graphique 3

Ce spectre montre l'augmentation de l'ellipticité molaire à basse température (- 5 °C) et une stabilité de l'hélice encore à 55 °C. Cela va dans le sens des résultats observés pour l'étude

par RMN 1D de l'influence de la température sur nos oligomères. Lors de ces expériences, nous avons observé une stabilité de la structuration (*cf.* figure 78).

Le dichroïsme circulaire a conforté notre idée de structuration en hélice-12 à partir du tétramère **(-)-214**.

c) Etude de modélisation moléculaire

Avant d'appliquer les contraintes de RMN déterminées par expériences NOESY et ROESY, nous avons mené une étude de modélisation sur le tétramère, l'hexamère, l'octamère et le dodecamère du **(-)-(1*R*,2*R*)-trans-ACBC**. Dans cette partie, nous ne détaillerons que les essais réalisés sur l'octamère et l'hexamère qui reflètent la tendance conformationnelle observée pour les autres oligomères.

Nous avons étudié le comportement conformationnel de nos oligomères par les méthodes de dynamique moléculaire et de Monte-Carlo. Notre objectif était de voir si par l'une et/ou l'autre des méthodes, nous accédions à une structure en hélice de minimum global d'énergie.

La dynamique moléculaire permet de réaliser des calculs plus rapidement mais en contre partie nous pouvions être limités dans l'exploration de la surface d'énergie potentielle. Par contre, la méthode de Monte-Carlo va s'affranchir de ces barrières énergétiques en recalculant la somme des termes de l'énergie potentiel. Le contre-coup étant un temps de calcul plus long.

a) Dynamique moléculaire sur l'octamère **(-)-219**

Afin d'accéder au résultat de la dynamique moléculaire appliquée à l'octamère **(-)-219**, nous avons défini le protocole suivant :

- 1) l'oligomère a été conçu avec une disposition étendue
- 2) nous avons sélectionné le champ de force MMFFs 94, adapté à la nature des molécules que nous voulions étudier
- 3) nous avons défini la constante diélectrique (continuum diélectrique)
- 3) nous avons utilisé des conditions périodiques classiques
- 4) la température du système a été fixée à 300 K
- 5) le temps de calcul a été défini à 500 000 fs

Les calculs ont été réalisés selon trois continua diélectriques : dans le vide, dans le chloroforme et enfin dans la pyridine qui est notre solvant d'analyse pour la RMN à deux dimensions. Une fois le calcul de dynamique achevé, nous avons traité les données par une classification croissante des énergies potentielles. Ensuite, nous avons retenu les meilleures structures, et celles-ci ont été minimisées avec l'algorithme de Powell pour conduire à un nouveau classement selon l'énergie potentielle.

Quel que soit le continuum dans lequel a été exécuté le calcul, nous avons obtenu une structure en hélice-12 de minimum d'énergie potentielle (Figure 92). Dans le vide (Figure 92a), la structure de minimum d'énergie est une hélice-12 parfaite. Mais comme nous sommes dans le vide, la structure va se replier au maximum pour optimiser les énergies d'interactions. Dans un continuum de chloroforme, nous avons obtenu un résultat quasi identique puisque le chloroforme possède une constante diélectrique relativement faible ($\epsilon = 4.8$) (Figure 92b). La dynamique réalisée dans la pyridine nous a aussi conduit à une structure en hélice-12. Cette dernière montre un relâchement du résidu C-terminal possible puisque l'oxygène du carboxylate de méthyle n'est pas impliqué dans une liaison hydrogène intramoléculaire (Figure 92c).

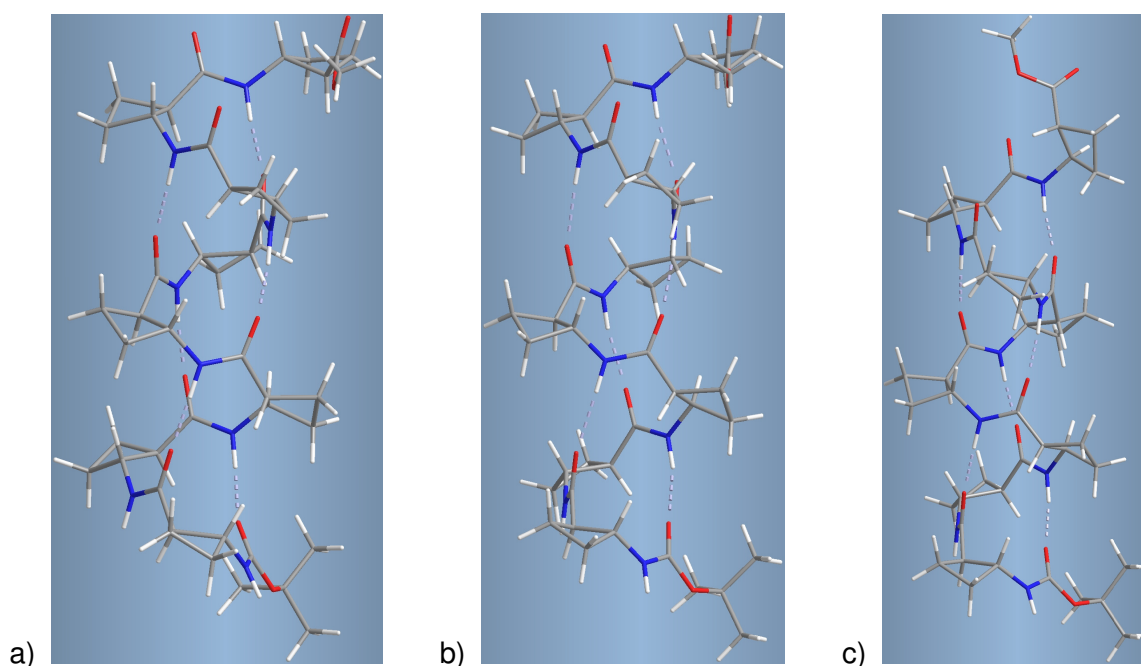


Figure 92 : a) vide, b) chloroforme, c) pyridine

La projection horizontale de l'hélice-12 montre une parfaite hélicité du sillon avec une répartition en quinconce des cyclobutanes (Figure 93).

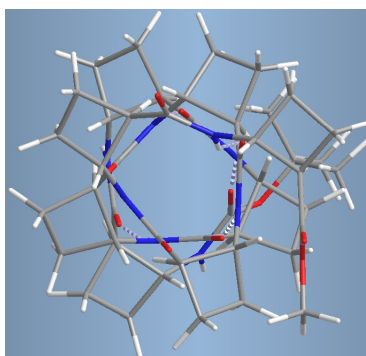


Figure 93

Avec la dynamique moléculaire, nous avons observé la structure en hélice-12 pour l'octamère, que ce soit dans le vide, le chloroforme ou la pyridine.

Nous avons également étudié l'influence des molécules discrètes dans une dynamique avec boîte de solvant. L'étude a été menée dans le chloroforme et la pyridine et les résultats ont été identiques à ceux observés avec le continuum.

b) Monte-Carlo sur l'octamère (–)-**219**

Pour la méthode stochastique de Monte-Carlo, nous sommes partis de la structure étendue de l'octamère (–)-**219**, et nous avons lancé le calcul aléatoire avec 50 000 itérations et avec la constante diélectrique du chloroforme. Après traitement des données, nous avons obtenu à nouveau une structure de minimum d'énergie en hélice-12 (Figure 94a). La projection horizontale montre une parfaite hélicité, et le groupement *tert*-butyle du résidu *N*-terminal est légèrement excentré par rapport à l'axe de l'hélice (Figure 94b).

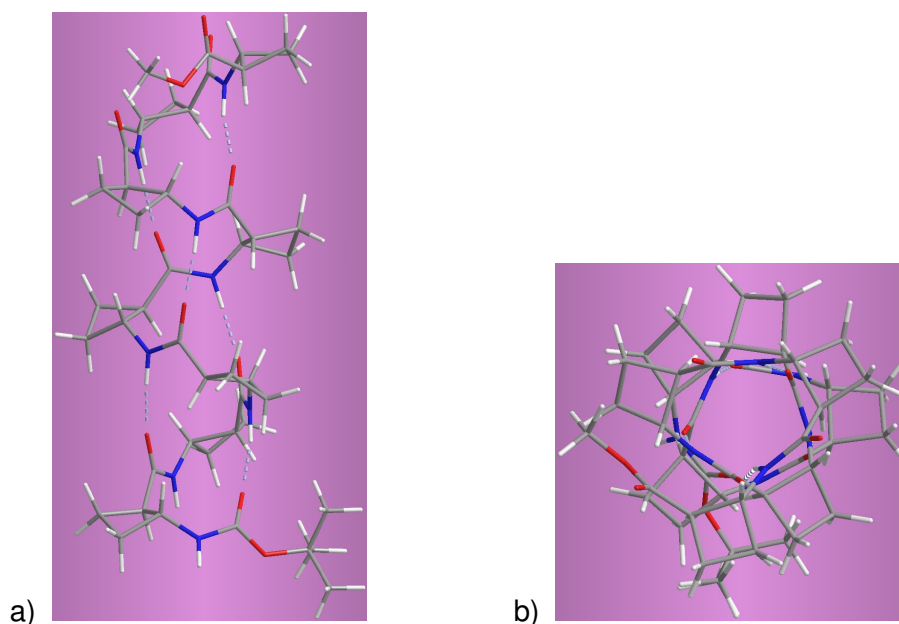


Figure 94

En résumé de cette étude sur l'analyse conformationnelle sans contrainte nous avons observé la formation d'une hélice-12, que ce soit par le biais de la dynamique moléculaire ou du Monte-Carlo. A fortiori, les résultats de la dynamique avec contraintes devraient donner les mêmes résultats.

c) Dynamique sous contraintes

Nous avons réalisé la dynamique sous contraintes avec l'hexamère **(-)-217**. Pour effectuer cette opération, nous avons appliqué à certains critères explicités ci-dessous :

- 1) à partir des spectres à deux dimensions, nous avons établi une interprétation cohérente des corrélations nOe de l'oligomère.
- 2) nous avons alors extrait des corrélations entre protons distants dans la séquence peptidique.
- 3) à partir des volumes des corrélations, nous avons pu en déduire les distances entre les protons de chaque corrélation.
- 4) Dans la mesure du possible, les valeurs d'angles dièdres ont été déterminées à partir du spectre de RMN ^1H grâce aux constantes de couplage 3J de $\text{H-N-C}_\beta\text{-H}$
- 5) Les contraintes de RMN ont été alors additionnées aux paramètres de calcul et la dynamique moléculaire a pu être lancée avec l'hexamère **(-)-217**.
- 6) Le traitement a été identique à celui décrit précédemment pour la dynamique sans contrainte. Les structures de meilleurs minima ont été sélectionnées, puis minimisées

sous contraintes. Elles ont été de nouveau minimisées sans contrainte pour fournir les structures finales qui ont été analysées par la suite.

La figure 95 reflète le cheminement que nous avons suivi pour lancer les calculs de dynamique sous contraintes.

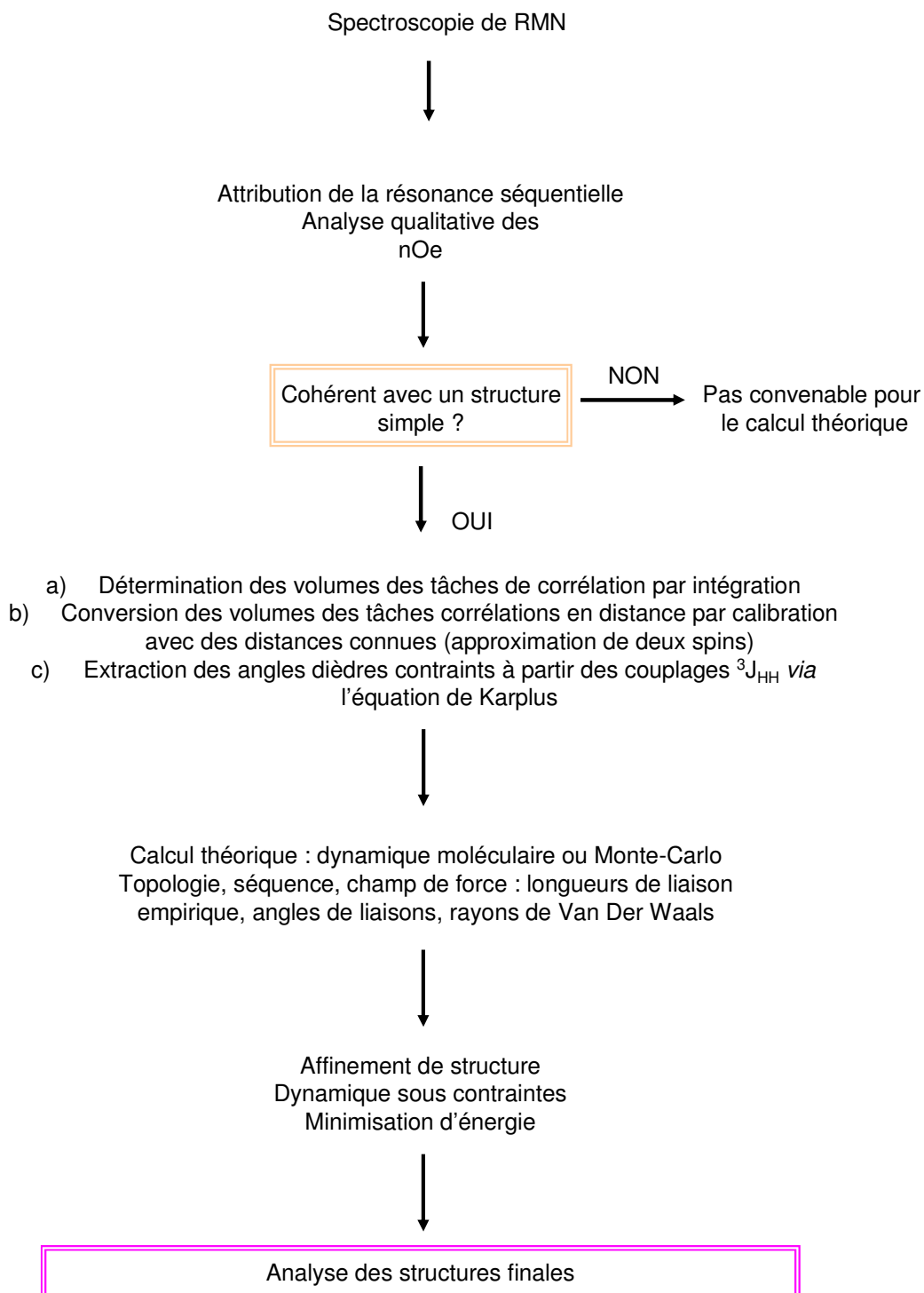


Figure 95

En reprenant les points détaillés ci-dessus, nous avons validé l'étape de "cohérence", i.e. l'éclatement des signaux de RMN ^1H pour l'hexamère **(-)-217** de la structure pour une étude de modélisation moléculaire. A partir de là, nous avons traité les corrélations nOe obtenues par RMN 2D de l'hexamère **(-)-217**, et chaque corrélation utile pour la dynamique a été intégrée (Tableau 30). Nous avons pu ensuite remonter à la distance inter-protons associée à chaque corrélation, ceci à l'aide de la formule suivante :

$$r_{ij} = r_{\text{ref}} \times (a_{ij} / a_{\text{ref}})^{1/6}$$

Où r_{ij} : distance calculée entre les atomes homonucléaires i et j.

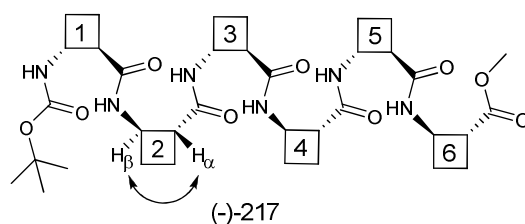
r_{ref} : distance du couple de protons référence (**C_βH_2 - $\text{C}_\alpha\text{H}_2$: 3,136 Å**).

a_{ij} : volume du couple ij

a_{ref} : volume du couple de protons référence

Le couple de protons C_βH - C_αH a été choisi comme référence car ces deux protons sont figés par la contrainte du cyclobutane. Il est donc facile d'obtenir la distance internucléaire entre les deux noyaux d'hydrogène à l'aide de la modélisation moléculaire. Ainsi, avec le volume de la tache de corrélation du couple, nous pouvons calculer les distances des autres couples nOe. Le couple C_βH_2 - $\text{C}_\alpha\text{H}_2$ a été choisi arbitrairement, n'entraînant aucune conséquence dans les calculs.

Ces calculs présentent une incertitude qui découle du phénomène de diffusion de spin du milieu. On applique communément une marge d'incertitude de + ou - 15 % sur la distance nOe.



attribution	aij	calcul de distance (Å)	d -15 %	d +15 %
C _β H1- C _α H3	0,983	3,14	2,67	3,62
C _β H2- C _α H4	0,5201	3,50	2,97	4,02
C _β H3- C _α H5	0,5164	3,50	2,98	4,03
C _β H4- C _α H6	2,0764	2,78	2,36	3,19
C _α H2-NH2	1,4912	2,93	2,49	3,37
C _α H2-NH3	6,1132	2,32	1,97	2,67
C _α H1-NH1	6,4213	2,30	1,96	2,65
C _α H1-NH2	1,472	2,94	2,50	3,38
C _α H3-C _α H1	1,8352	2,83	2,41	3,26
C _β H1-NH3	0,483	3,54	3,01	4,07
C _β H2-NH4	1,0764	3,10	2,63	3,56
C _β H3-NH5	0,8265	3,24	2,75	3,72
C _β H4-NH6	0,7693	3,28	2,78	3,77

Tableau 30

En plus des contraintes de distance, nous avons apporté une contrainte de l'angle de torsion H-Ni-C_βi-H définie à l'aide de la constante de couplage associée à chaque angle de torsion i. A ce stade, nous avons défini les contraintes de RMN associées à l'hexamère (-)-217. Nous avons alors construit l'oligomère sous sa forme étendue, puis nous avons appliqué les contraintes dans les paramètres pour ensuite lancé le calcul de dynamique sous contrainte (Figure 96).

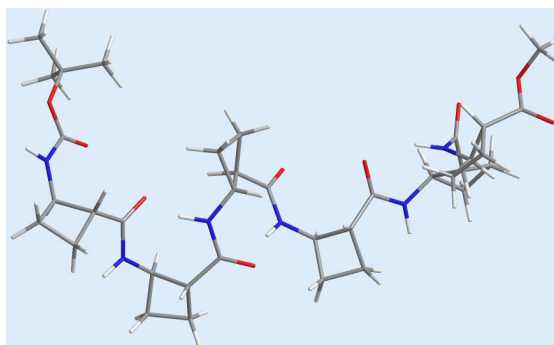


Figure 96

Une fois le calcul terminé, nous avons traité les données selon le protocole détaillé en début de section. Ainsi, après traitement des données de modélisation, nous sommes arrivés à une structure de minimum d'énergie en hélice-12 (Figure 97a).

La superposition des différents groupes de conformères montre un bon recouvrement du cœur de l'oligomère (Figure 97b). La partie C-terminale, quant à elle, présente un plus grand degré de liberté, parce qu'elle n'est pas contrainte par une liaison hydrogène intramoléculaire.

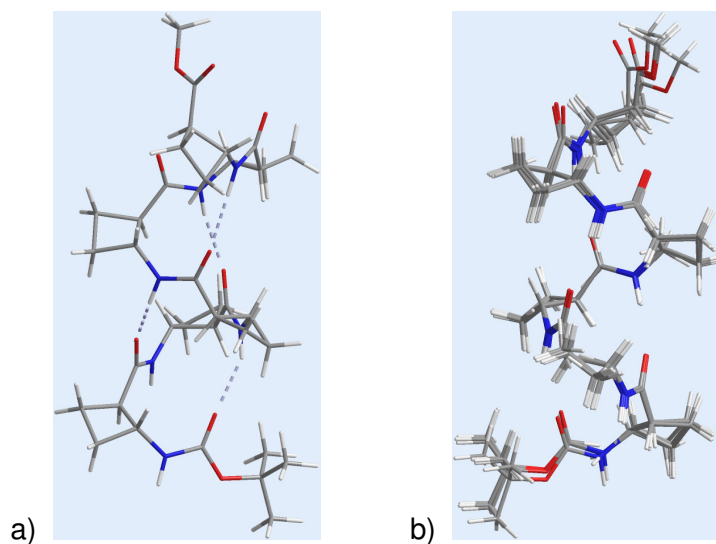


Figure 97

Les études que nous avons réalisées en modélisation moléculaire nous ont permis d'observer la formation de l'hélice-12. De plus, nous avons confirmé cette structure par le biais de trois méthodes complémentaires : la dynamique moléculaire, le Monte-carlo et la dynamique sous contrainte. Ces observations viennent directement corroborées les conclusions que nous avons émises grâce à l'interprétation des spectres ^1H RMN 1D et 2D.

CONCLUSION

Le premier objectif de ce travail a été d'accéder aux quatre stéréoisomères énantiopurs de l'acide 2-aminocyclobutanecarboxylique, de manière efficace et reproductible en grande quantité. Pour cela, nous avons mis au point deux stratégies complémentaires :

- une synthèse diastéréosélective à partir de l'adduit chiral **(+)-129**,
- un dédoublement racémique à partir du *cis*-ACBC **(±)-105**.

La synthèse diastéréosélective nous a permis d'isoler les quatre stéréoisomères avec une pureté énantiomérique supérieure à 97 %. Cependant, cette stratégie présentait quelques inconvénients, notamment l'étape de purification des diastéréoisomères **(-)-130** et **(-)-131** et l'épimérisation du *cis*-ACBC **105**. En complément, le rendement global de synthèse des 2 énantiomères du *trans*-ACBC était faible. C'est pour ces raisons que nous avons envisagé de développer une nouvelle stratégie.

Cette nouvelle stratégie passait par le dédoublement racémique. Nous avons pu ainsi séparer le mélange racémique **(±)-105** avec les amines chirales **(-)-10** et **(-)-174**. A partir des diastéréoisomères séparés et selon la méthode adaptée, nous avons pu isoler les carboxamides primaires **(+)-194** et **(-)-194** énantiopurs. A partir de ces intermédiaires clés, il nous a été possible d'obtenir rapidement les 4 stéréoisomères énantiomériquement enrichis de l'ACBC. Dans cette seconde stratégie, nous avons optimisé significativement le nombre d'étapes de synthèse et également le rendement global du *trans*-ACBC, passant de 13 % pour la première stratégie à 34 % dans la seconde. De plus, nous avons développé une méthode d'épimérisation et d'hydrolyse quantitative des carboxamides en une étape.

Grâce à ces deux voies de synthèse permettant d'accéder aux stéréoisomères de l'ACBC, nous nous sommes dirigés vers la synthèse des oligomères du *trans*-(1*R*,2*R*)-ACBC **110**. A partir de ce monomère, nous avons préparé le dimère **(-)-209**, le tétramère **(-)-214**, l'hexamère **(-)-217** et enfin l'octamère **(-)-219**.

Le second objectif de cette thèse a été de mener une étude conformationnelle pour déterminer quelle structure tridimensionnelle pouvait adopter nos β -peptides. Nous savions déjà que l'acide aminé cyclobutanique de configuration relative *trans* adoptait une conformation synclinale favorisant la formation d'une hélice dans un β -peptide. Nous avons alors utilisés les techniques spectroscopiques de RMN à une et deux dimensions ainsi que le dichroïsme circulaire pour mener l'étude conformationnelle. Au terme de cette étude, les résultats d'analyse ont montré clairement l'existence de hélice-12 à partir du tétramère **(-)-214**.

Pour corroborer ses résultats, nous avons ensuite mené une étude de modélisation moléculaire selon trois méthodes de calculs complémentaires. Quel que soit la méthode utilisée, nous sommes arrivés à une structuration en hélice-12.

En conclusion, nous avons mis au point deux voies de synthèse complémentaires pour accéder aux quatre stéréoisomères énantionpurs de l'ACBC (Figure 98).

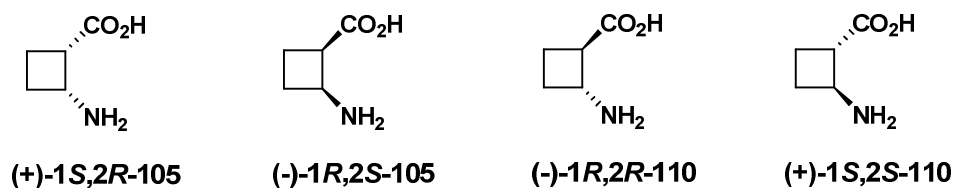
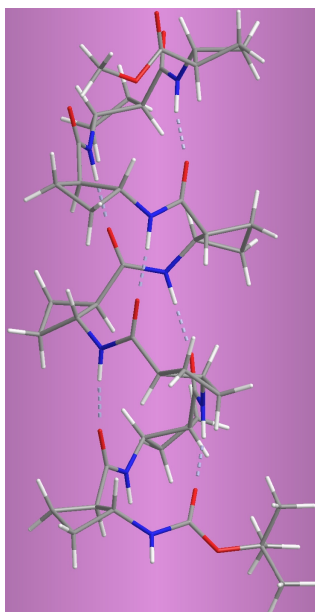


Figure 98

A partir du résidu **(-)-(1R,2R)-110**, nous avons alors préparé différents oligomères qui ont montré une propension à se structurer en hélice-12, et ceci dès le tétramère.



Hélice-12

Les perspectives découlant de ces travaux pourraient être d'étudier la limite de conservation de cette hélice, en solution aqueuse ou avec les solvants organiques, par l'apport de substituants sur le carbocycle. En outre, il serait intéressant d'étudier la structuration des oligomères du β -aminoacide cyclopropanique (ACPrC).

EXPERIMENTAL SECTION

(In English)

1) General methods

a) Instrumentation

Nuclear magnetic resonance (**NMR**) spectra were measured in deuterated solvents (CDCl_3 , D_2O , acetone- d_6 , CD_3OD , DMSO-d_6) on a Bruker AC-400 spectrometer, operating at 400 MHz for ^1H and 100 MHz for ^{13}C J-modulation. Residual solvent signals were used as internal reference. Chemical shifts (δ) are reported in ppm, coupling constant values (J) are given in hertz. Multiplicity abbreviations: s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quadruplet, qu = quintuplet, dd : double doublet, dq = double quadruplet, hept = heptuplet, bs = broad singlet, m = multiplet. The NMR spectra of all main products are totally interpreted.

Melting points (**MP**) were determined on a Reichert microscope apparatus and are uncorrected.

Infrared (**IR**) spectra were recorded in CHCl_3 solution or in a KBr pellet on a Perkin-Elmer 881 spectrometer; only structurally important peaks (ν) are present in cm^{-1} . Signal abbreviation: br : broad band.

Optical rotations were measured on a Jasco DIP-370 polarimeter, using a 10 cm quartz cell. Values for $[\alpha]_D^T$ were obtained with the D-line of sodium at the indicated temperature T , using solutions of concentration (c) in units of g/100 mL.

Circular Dichroism: Dry peptide samples were weighed on a Cahn microanalytical balance and dissolved in an appropriate amount of HPLC-grade methanol. Sample cells of 1 mm and 5 mm path length were used. Data were collected on a Jasco J-715 spectrometer at 20 °C. Baseline spectra were recorded with only the solvent in the cell, and unless stated were subtracted from the raw data. Data were converted to molar ellipticity ($\text{deg cm}^2 \text{dmol}^{-1}$) according to the following equation: $[\theta] = (100 \times \theta) / (C \times l \times n)$

Chemical ionization mass spectra (**CI-MS**) using methane as ionization gas and electronic impact mass spectra (**EI-MS**) were recorded on an HP 5989B spectrometer (70 eV). Electrospray ionization mass spectra (**ESI-MS**) were recorded on a micro q-tof Micromass (3000 V) and high resolution mass spectra (**HR-MS**) were recorded on the same instrument with an internal lock mass (H_3PO_4) and an external lock mass (Leu-enkephalin). Mass spectra using liquid chromatography (**LC-MS**) were recorded on a micro q-tof Micromass (3000 V) with electrospray ionization and HPLC separations were carried out on Alliance system using a reversed-phase C18 Nucleosil column (100 mm x 2.1 mm, 5 μm pore size) with a flow rate of 0.3 mL min^{-1} .

Elementary Analyses (**Anal**) were carried out on a Thermofinnigan FlashEA 1112 apparatus in the Microanalytical Laboratory, UMR 7565 (Nancy).

b) Chromatography

TLC were carried out on silica gel (60 F254, on alumina; Merck), visualised by UV fluorescence at 254 nm and revealed with

-ninhydrine for aminoacids and peptides (0.3% in *n*-Butanol)

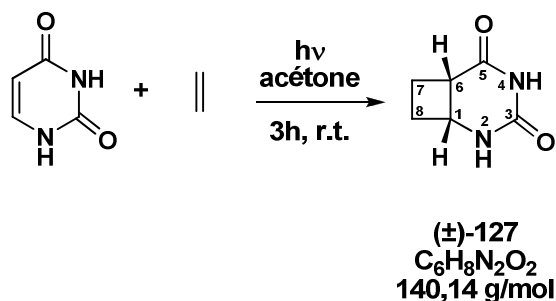
Flash chromatography was carried out on 15 cm length columns of silica gel (40-63 μm , Merck) using the Still methodology.

c) Chemical and Solvents

All solvents designated as "dry" as well as some liquid reagents were purified by distillation under argon, as follows:

- CH_3CN and DMF were distilled from CaH_2 and stored over 3 Å molecular sieves.
- CH_2Cl_2 was distilled from CaH_2 .
- MeOH was distilled from CaH_2 and stored over 3 Å molecular sieves.
- Toluene was dried with pieces of sodium.
- NEt_3 was distilled from CaH_2 and stored over 3 Å molecular sieves.
- NH_4Et was distilled from KOH and stored over 3 Å molecular sieves.
- Et_2O and THF were distilled from potassium with benzophenone.
- TMS-Cl was distilled under reduced pressure from NBu_3 .

(±)-*cis*-2,4-diazabicyclo[4.2.0]octane-3,5-dione (±)-127



A solution of uracil (3.00 g, 26.76 mmol) in acetone/water (1 L, 1:1, v/v) was deoxygenated with an argon stream during 15 min, then irradiated for 3 h while ethylene was bubbled through. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography using EtOAc/MeOH (95:5) as eluent to yield **(±)-127** as a white powder (3.30 g, 23.55 mmol).

Yield = 88 %

TLC R_f = 0.25 (EtOAc)

MP = 258-259 °C

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3230, 3080, 1720

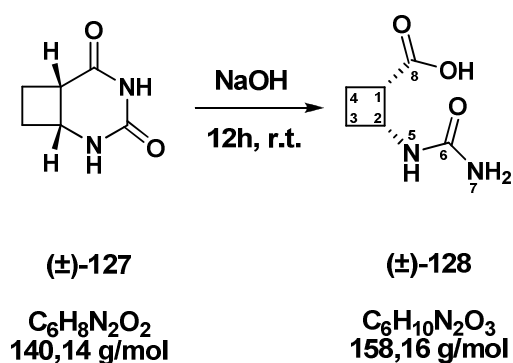
NMR 1H (DMSO- d_6) δ (ppm) : 1.92 (m, 2H, H-7), 2.18 (m, 2H, H-8), 3.11 (m, 1H, H-6), 3.90 (m, 1H, H-1), 7.68 (s, 1H, NH), 10.02 (s, 1H, NH).

NMR ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm) : 21.4, 30.6, 37.2, 44.8, 152.7, 173.3.

MS (CI): m/z = 141 $[M + H]^+$.

Anal. : calcd for $C_6H_8N_2O_2$: C, 51.42 ; H, 5.75 ; N, 19.99 ; found C, 51.35 ; H, 5.77 ; N, 19.83

(±)-cis-2-[(aminocarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylic acid (±)-128



Compound **(±)-127** (3.00 g, 21.41 mmol) was dissolved in 0.5 M NaOH solution (150 mL) and stirred overnight at room temperature. Cation exchange resin (Bio-Rad AG 50W×8, H⁺, 20-50 mesh) was then added until pH was about 4. Filtration and then evaporation of water from the filtrate left compound **(±)-128** as a white solid (2.85 g, 20.34 mmol).

Yield = 95 %

MP = 187-189 °C

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3400, 3320, 3220, 1700, 1650

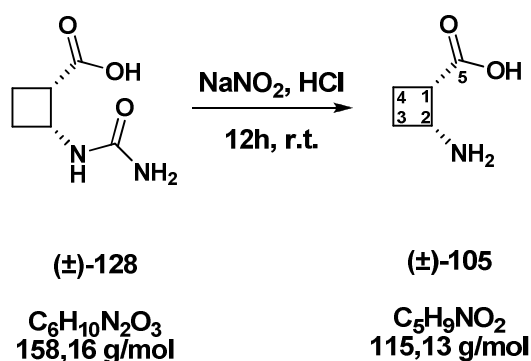
NMR ¹H (DMSO-d₆) δ (ppm) : 1.79 (m, 2H, H-4), 2.08 (qu, J = 9.9 Hz, 1H, H-3), 2.17 (m, 1H, H-3), 3.14 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.56 (s, 2H, NH₂), 6.23 (bs, 1H, NH).

NMR ¹³C (DMSO-d₆) δ (ppm) : 17.4, 29.2, 44.9, 45.8, 157.4, 174.7.

MS (CI): m/z = 159 [M + H]⁺.

Anal. : calcd for C₆H₁₀N₂O₃ : C, 45.57 ; H, 6.37 ; N, 17.71 ; found C, 45.68 ; H, 6.48 ; N, 17.64

(±)-*cis*-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (±)-105



Compound **(±)-128** (2.85 g, 20.34 mmol) was dissolved in 3.5 M HCl solution (475 mL). Sodium nitrite (1.42 g, 20.34 mmol) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 5×8W, H⁺, 50-100 mesh). The column was washed with water until the eluant was neutral, then the product was eluted with 1 M NH₄OH solution. After pooling and evaporation of appropriate fractions, pure **(±)-105** was obtained as a white solid (1.99 g, 17.29 mmol).

Yield = 85 %

TLC *R_f* = 0.4 (n-propanol/H₂O, 7:3)

MP = 128-130 °C

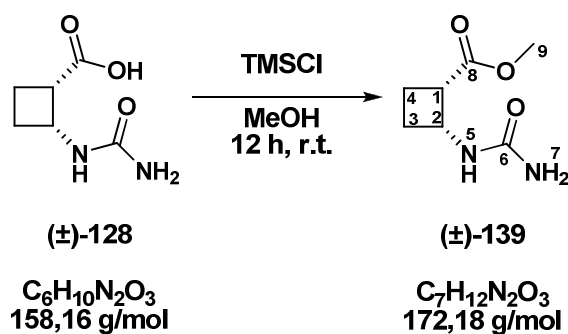
IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3422, 2957, 1542, 1406, 1293

NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 2.05 (m, 1H, H-4), 2.25 (m, 2H, H-4 and H-3), 2.35 (m, 1H, H-3), 3.22 (m, 1H, H-1), 3.92 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-2).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21.1, 24.9, 41.3, 45.4, 180.9.

HR-MS : *m/z* calcd for [C₅H₁₀NO₂+H]⁺ 116.0712 ; found 116.0706

Methyl (±)-*cis*-[2-(aminocarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (±)-139



Trimethylsilyl chloride (0.71 g, 0.84 mL, 6.81 mmol) was added to a solution of acid **(±)-128** (0.500 g, 3.16 mmol) in dry methanol (15 mL) and the mixture was stirred at rt overnight. The excess of methanol was then evaporated under reduce pressure. Purification by flash chromatography on silica gel using EtOAc/MeOH (98:2) as eluent afforded **(±)-139** as a white solid (0.408 g, 2.37 mmol).

Yield = 75 %

TLC R_f = 0.52 (EtOAc/MeOH, 90:10)

MP = 129-132 °C

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3469, 1710, 1654, 1559, 705.

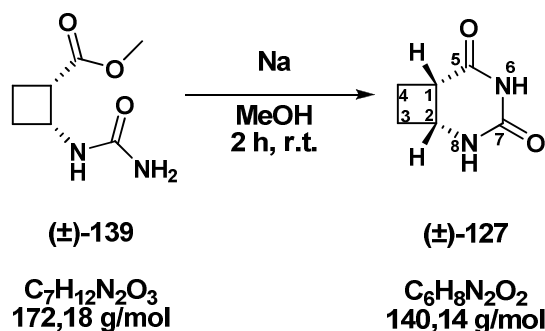
NMR ^1H (DMSO- d_6) δ (ppm) : 1.84 (m, 2H, H-4), 2.05 (qu, J = 9.9 Hz, 1H, H-3), 2.18 (m, 1H, H-3), 3.24 (m, 1H, H-1), 3.61 (s, 3H, H-9), 4.43 (qu, J = 9.0 Hz, 1H, H-2), 5.50 (bs, 2H, H-7), 6.16 (d, J = 8.5 Hz, 1H, H-5).

NMR ^{13}C (DMSO- d_6) δ (ppm) : 17.0 (CH_2 , C-4), 28.9 (CH_2 , C-3), 45.2 (CH, C-2), 45.9 (CH, C-1), 51.2 (CH_3 , C-9), 157.2 (C=O, C-6), 173.6 (C=O, C-8).

HR-MS : m/z Calcd for $[\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{Na}]^+$ 195.0746 ; Found 195.0746 (+ 0.2 ppm)

Anal. : Calcd for $\text{C}_7\text{H}_{12}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 48.8; H, 7.02; N, 16.27 ; Found C, 48.7; H, 6.97; N, 16.19 .

(±)-cis-2,4-Diazabicyclo[4.2.0]octane-3,5-dione (±)-127



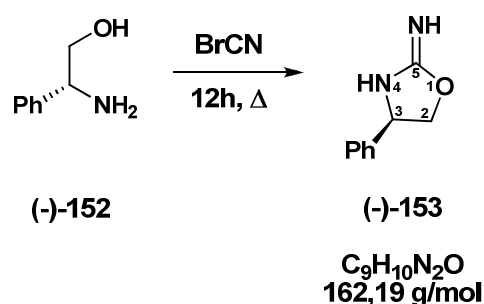
Pieces of sodium (0.033 g, 1.40 mmol) were added into dry methanol (20 mL). Then **(±)-139** (0.048 g, 0.28 mmol) was added to the solution and the mixture was stirred 2h. The reaction was quenched by addition of NH₄Cl powder (0.108 g, 2.00 mmol) and water (5 mL) was added. The excess of methanol was then evaporated under reduce pressure and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 10 mL). The combined organic layers were dried with MgSO₄, filtrated and evaporated. The crude was purified by flash chromatography using EtOAc/MeOH (95:5) as eluent to afford **(±)-127** as a white solid (0.368 g, 0.26 mmol).

Yield = 93 %

NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 1.92 (m, 2H, H-4), 2.18 (m, 2H, H-3), 3.11 (m, 1H, H-1), 3.90 (m, 1H, H-2), 7.68 (s, 1H, NH), 10.02 (s, 1H, NH).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21.4 (CH₂, C-4), 30.6 (CH₂, C-3), 37.2 (CH, C-2), 44.8 (CH, C-1), 152.7 (C=O, C-7), 173.3 (C=O, C-5).

(-)-(4*R*)-4-Phenyloxazolidin-2-ylideneamine (-)-153



To a solution of (*R*)-phenylglycinol **(-)-152** (2.00 g, 14.6 mmol) in EtOH (20 mL) was added, at room temperature, cyanogen bromide (1.77 g, 16.7 mmol). After 12h at reflux, ethanol was evaporated under reduced pressure and the residue was dissolved in a 1 M aqueous solution of NaOH (30 mL) and extracted with dichloromethane (3 x 20 mL). The organic phase was concentrated at reduced pressure to afford quantitatively compound **(-)-153** as a white solid (2.154 g, 13.28 mmol).

Yield = 91 %

MP = 113-115 °C

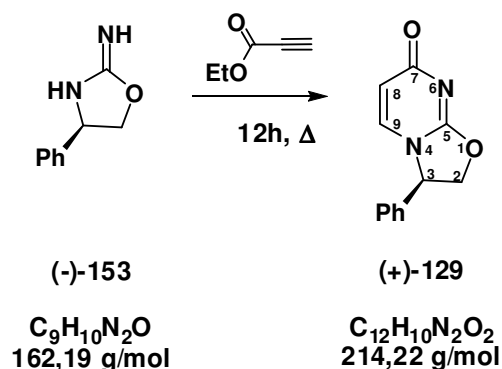
[α]_D²⁷ – 13 (*c* 2.00, MeOH)

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 4.03 (t, *J* = 7.6 Hz, 1H, H-4), 4.60 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5), 5.08 (t, *J* = 8.3 Hz, 1H, H-5), 5.24 (bs, 2H, H-3 et H-6), 7.24-7.36 (m, 5H, CH_{ar}).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 67.4, 75.2, 127.3, 128.6, 143.6, 162.0.

MS (CI): *m/z* = 163 [M + H]⁺.

(+)-(3*R*)-3-Phenyl-2,3-dihydro oxazolo [3,2-*a*] pyrimidin-7-one (+)-129



To a solution of **(-)-153** (800 mg, 4.94 mmol) in ethanol (15 mL) was added, at room temperature, ethyl propiolate (0.88 mL, 9.88 mmol). After 12 h at reflux, ethanol was evaporated under reduced pressure and the residue was chromatographed on silica gel (MeOH/EtOAc, 10:90) to afford product **(+)-129** as a white solid (0.634 g, 2.96 mmol).

Yield = 60 %

TLC R_f = 0.10 (EtOAc/MeOH, 9:1)

MP > 295 °C

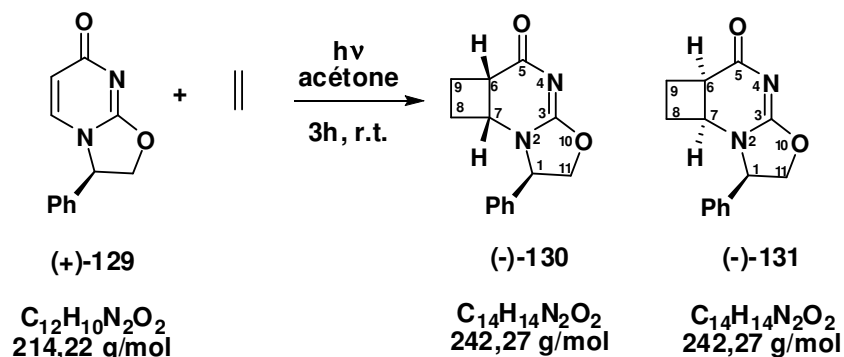
[α]_D²⁷ + 19 (*c* 2.04, MeOH)

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 4.56 (dd, *J* = 7.6, 9.1 Hz, 1H, H-2), 5.07 (t, *J* = 9.1 Hz, 1H, H-2), 5.43 (dd, *J* = 7.8, 8.5 Hz, 1H, H-3), 6.05 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-8), 6.96 (d, *J* = 7.5 Hz, 1H, H-9), 7.32-7.34 (m, 2H, CH_{ar}), 7.44-7.56 (m, 3H, CH_{ar}).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 62.0, 74.0, 110.0, 127.2, 129.9, 130.1, 135.1, 135.6, 161.0, 172.0.

MS (CI): *m/z* = 215 [M + H]⁺.

(*R*)-1-phenyl-1,2,5a,6,7,7a-hexahydro-5*H*-cyclobuta[*e*][1,3]oxazolo[3,2-*a*]pyrimidin-5-one (–)-130 and (–)-131



A solution of (***R***)-**129** (1.10 g, 5.13 mmol) in acetone (1 L) was deoxygenated with an argon stream during 15 min, then irradiated for 3 h while ethylene was bubbled through. The solvent was then removed under reduced pressure and the crude product was purified by chromatography (gradient of EtOAc/MeOH from 100:0 to 95:5), two diastereoisomers (**(–)-130** (0.609 g, 2.51 mmol) and **(–)-131** (0.390 g, 1.61 mmol) were isolated as white solids.

(–)-130

Yield = 49 %

TLC R_f = 0.20 (EtOAc/MeOH, 95:5)

MP > 300 °C

$[\alpha]_D^{27}$ – 187 (*c* 1.00, CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm^{–1}) = 2950, 1660

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 2.23-2.29 (m, 2H, H-9), 2.38-2.44 (m, 2H, H-8), 3.26 (q, *J* = 8.2 Hz, 1H, H-6), 3.83 (dt, *J* = 8.6, 6.4 Hz, 1H, H-7), 4.36 (dt, *J* = 12.9, 7.0 Hz, 1H, H-11), 4.87-4.95 (m, 2H, H-1, H-11), 7.30 (m, 2H, CH_{ar}), 7.46 (m, 3H, CH_{ar}).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 24.2, 26.8, 35.9, 47.3, 59.9, 72.6, 127.0, 129.5, 129.6, 134.9, 167.0, 181.0.

MS (CI): *m/z* = 243 [M + H]⁺.

Anal. : calcd for C₁₄H₁₄N₂O₂ : C, 69.40 ; H, 5.83 ; N, 11.56 ; found C, 68.91 ; H, 5.89 ; N, 11.38

(–)-131

Yield = 31 %

TLC R_f = 0.10 (EtOAc/MeOH, 95:5)

MP = 179-182 °C

[α]_D²⁷ – 8 (c 1.00, CHCl₃)

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 2950, 1670

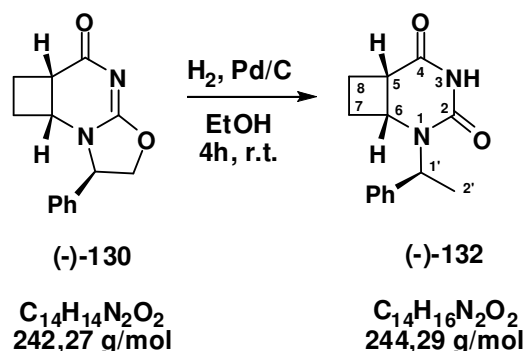
NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.75–1.80 (m, 1H, H-9), 1.89–1.94 (m, 1H, H-9), 2.18–2.32 (m, 2H, H-8), 3.17–3.23 (m, 1H, H-6), 4.03 (q, J = 8.5 Hz, 1H, H-7), 4.40 (m, 1H, H-11), 4.82–4.88 (m, 2H, H-1, H-11), 7.35–7.39 (m, 2H, CH_{ar}), 7.42–7.47 (m, 3H, CH_{ar}).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 23.9, 29.6, 36.7, 49.8, 63.1, 72.7, 127.4, 129.2, 129.5, 136.2, 167.0, 181.6.

MS (CI): m/z = 243 [M + H]⁺.

Anal. : calcd for C₁₄H₁₄N₂O₂ : C, 69.40 ; H, 5.83 ; N, 11.56 ; found C, 68.96 ; H, 6.11 ; N, 11.17

(-)-(1*R*,6*S*)-2-[(1*S*)-1-phenylethyl]-2,4-diazabicyclo[4.2.0]octane-3,5-dione (-)-132



A solution of compound **(-)-130** (2.00 g, 8.18 mmol) in EtOH (200 mL) was stirred under H_2 (4 atm) in presence of 10% Pd/C (0.890 g, 0.84 mmol) for 4h. After filtration through a pad of celite, the filtrate was concentrated to give compound **(-)-132** as colourless crystals (1.99 g, 8.17 mmol).

Yield = 100 %

TLC R_f = 0.40 (EtOAc/cyclohexane, 5:5)

MP = 130-131 °C

$[\alpha]_D^{27}$ = -139 (c 1.00, CHCl_3)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3240, 1700

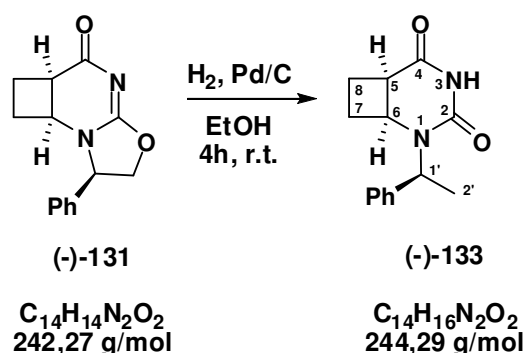
NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.23-1.28 (m, 1H), 1.57 (d, J = 7.0 Hz, 3H, CH_3), 1.76-1.82 (m, 1H), 1.93-2.07 (m, 2H), 3.22 (m, 1H, H-6), 3.93 (q, J = 8.0 Hz, 1H, H-1), 5.83 (q, J = 7.0 Hz, 1H, H-2'), 7.26-7.38 (m, 5 H, Ph), 8.15 (bs, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 15.9, 21.6, 31.7, 40.3, 46.5, 51.3, 127.9, 128.0, 128.6, 139.4, 151.7, 172.7.

HR-MS : m/z calcd for $[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{Na}]^+$ 267.1109 ; found 267.1115

Anal. : calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 68.83 ; H, 6.60 ; N, 11.47 ; found C, 68.41 ; H, 6.70 ; N, 11.25

(-)-(1*S*,6*R*)-2-[(1*S*)-1-phenylethyl]-2,4-diazabicyclo[4.2.0]octane-3,5-dione (-)-133



A solution of compound **(-)-131** (0.920 g, 3.77 mmol) in EtOH (200 mL) was stirred under H_2 (4 atm) in presence of 10% Pd/C (0.413 g, 0.39 mmol) for 3 h. After filtration through a pad of celite, the filtrate was concentrated to give compound **(-)-133** as colourless crystals (0.910 g, 3.72 mmol).

Yield = 99 %

TLC R_f = 0.50 (EtOAc/cyclohexane, 5:5)

MP = 171-173 °C

$[\alpha]_D^{27}$ – 33 (*c* 1.00, CHCl_3)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3240, 1700

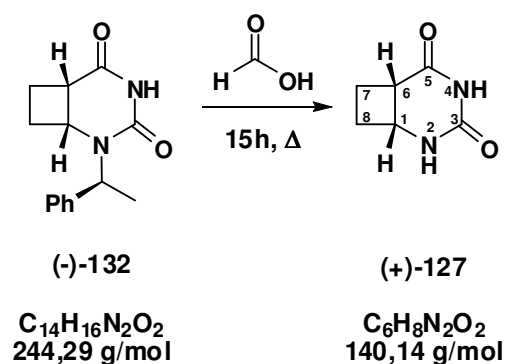
NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.53 (d, J = 7.2Hz, 3H, CH_3), 2.09-2.21 (m, 2H), 2.30-2.42 (m, 2H), 3.11 (m, 1H, H-6), 3.75 (q, J = 8.2 Hz, 1H, H-1), 5.80 (q, J = 7.2 Hz, 1H, H-2'), 7.30-7.40 (m, 5 H, Ph), 8.18 (bs, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.4, 21.9, 32.7, 40.2, 46.3, 51.6, 127.2, 127.9, 128.8, 139.9, 151.9, 172.7.

HR-MS : m/z calcd for $[\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2 + \text{Na}]^+$ 267.1109 ; found 267.1113

Anal. : calcd for $\text{C}_{14}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_2$: C, 68.83 ; H, 6.60 ; N, 11.47 ; found C, 68.68 ; H, 6.64 ; N, 11.46

(+)-(1*R*,6*S*)-2,4-diazabicyclo[4.2.0]octane-3,5-dione (+)-127



A solution of compound **(-)-132** (3.67 g, 15.0 mmol) in 97% formic acid (147 mL) was stirred under reflux during 15 h. Elimination of formic acid under reduced pressure left a brown solid which was washed with ether and then recovered by filtration. Compound **(+)-127** was obtained as a off-white solid after drying under vacuum (1.64 g , 11.7 mmol).

Yield = 78 %

MP = 247-249 °C

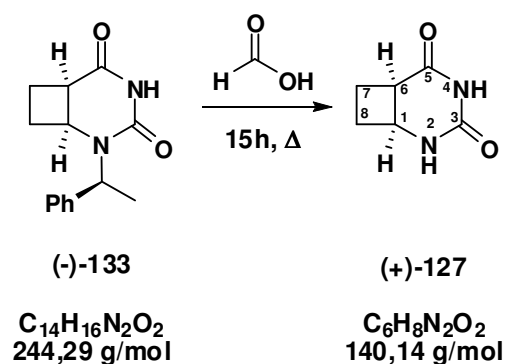
[α]_D²⁷ + 24 (*c* 1.00, HCO₂H)

NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 1.92 (m, 2H, H-7), 2.18 (m, 2H, H-8), 3.11 (m, 1H, H-6), 3.90 (m, 1H, H-1), 7.68 (s, 1H, NH), 10.02 (s, 1H, NH).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21.4, 30.6, 37.2, 44.8, 152.7, 173.3.

Other data: as for **(±)-127**, page 182

(–)-(1*S*,6*R*)-2,4-diazabicyclo[4.2.0]octane-3,5-dione (–)-127



A solution of compound **(–)-133** (2.43 g, 9.94 mmol) in 97% formic acid (100 mL) was stirred under reflux during 15 h. Elimination of formic acid under reduce pressure left a brown solid which was washed with ether and then recovered by filtration. Compound **(–)-127** was obtained as an off-white solid after drying under vacuum (1.08 g, 7.75 mmol).

Yield = 78 %

MP = 249-251 °C

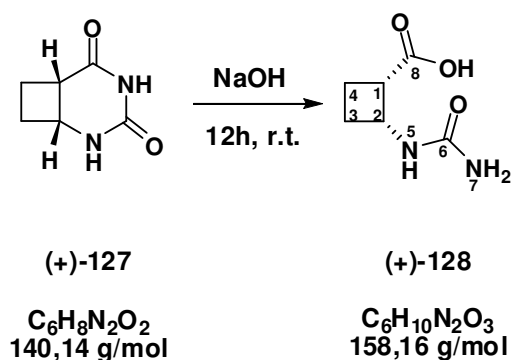
[α]_D²⁷ – 24 (*c* 1.00, HCO₂H)

NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 1.92 (m, 2H, H-7), 2.18 (m, 2H, H-8), 3.11 (m, 1H, H-6), 3.90 (m, 1H, H-1), 7.68 (s, 1H, NH), 10.02 (s, 1H, NH).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21.4, 30.6, 37.2, 44.8, 152.7, 173.3.

Other data: as for **(±)-127**, page 182

(+)-(1*S*,2*R*)-2-[(aminocarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylic acid (+)-128



Compound **(+)-127** (1.64 g, 11.7 mmol) was dissolved in 0.5 M NaOH solution (140 mL) and stirred overnight at room temperature. Cation exchange resin (Bio-Rad AG 50W×8, H⁺, 20-50 mesh) was then added until pH was about 4. Filtration and then evaporation of water from the filtrate left compound **(+)-128** as a white solid (1.70 g, 10.7 mmol).

Yield = 92 %

MP = 149-154 °C

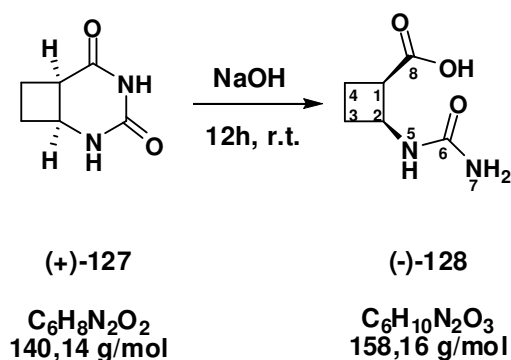
[α]_D²⁷ + 143 (*c* 1.02, HCO₂H)

NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 1.79 (m, 2H, H-4), 2.08 (qu, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3), 2.17 (m, 1H, H-3), 3.14 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.56 (s, 2H, NH₂), 6.23 (bs, 1H, NH).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 17.4, 29.2, 44.9, 45.8, 157.4, 174.7.

Other data: as for **(±)-128**, page 183

(–)-(1*R*,2*S*)-2-[(aminocarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylic acid (–)-128



Compound **(–)-127** (1.00 g, 7.14 mmol) was dissolved in 0.5 M NaOH solution (50 mL) and stirred overnight at room temperature. Cation exchange resin (Bio-Rad AG 50W×8, H⁺, 20-50 mesh) was then added until pH was about 4. Filtration and then evaporation of water from the filtrate left compound **(–)-128** as a white solid (1.12 g, 7.08 mmol).

Yield = 99 %

MP = 149-151 °C

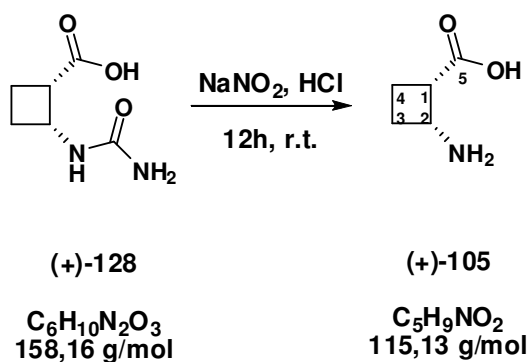
[α]_D²⁷ – 143 (*c* 1.02, HCO₂H)

NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 1.79 (m, 2H, H-4), 2.08 (qu, *J* = 9.9 Hz, 1H, H-3), 2.17 (m, 1H, H-3), 3.14 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.56 (s, 2H, NH₂), 6.23 (bs, 1H, NH).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 17.4, 29.2, 44.9, 45.8, 157.4, 174.7.

Other data: as for **(±)-128**, page 183

(+)-(1*S*,2*R*)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (+)-105



Compound **(+)-128** (1.70 g, 10.7 mmol) was dissolved in 3.5 M HCl solution (250 mL). Sodium nitrite (0.75 g, 10.7 mmol) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 5×8W, H⁺, 50-100 mesh). The column was washed with water until the eluant was neutral, then the product was eluted with 1 M NH₄OH solution. After pooling and evaporation of appropriate fractions, pure **(+)-105** was obtained as a white solid (1.08 g, 9.38 mmol).

Yield = 87 %

MP = 128-130 °C

[α]_D²⁷ + 71 (*c* 1.02, H₂O)

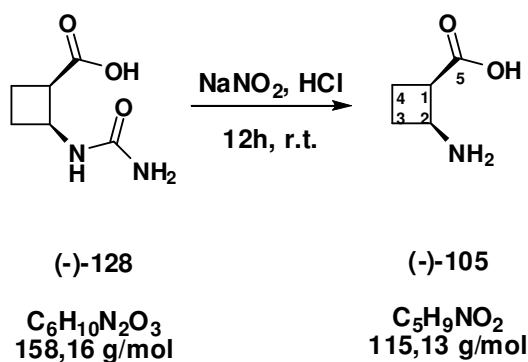
NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 2.05 (m, 1H, H-4), 2.25 (m, 2H, H-4 and H-3), 2.35 (m, 1H, H-3), 3.22 (m, 1H, H-1), 3.92 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-2).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21.1, 24.9, 41.3, 45.4, 180.9.

HPLC retention time: 7.2 min, ee > 97%.

Other data: as for **(±)-105**, page 184

(-)-(1*R*,2*S*)-2-aminocyclobutane carboxylic acid (-)-105



Compound **(-)-128** (0.660 g, 4.20 mmol) was dissolved in 3.5 M HCl solution (92 mL). Sodium nitrite (0.29 g, 4.20 mmol) was added and the mixture was stirred overnight at room temperature. The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 5×8W, H⁺, 50-100 mesh). The column was washed with water until the eluant was neutral, then the product was eluted with 1 M NH₄OH solution. After pooling and evaporation of appropriate fractions, pure **(-)-105** was obtained as a white solid (0.440 g, 3.82 mmol, 91%).

Yield = 91 %

MP = 126-128 °C

[α]_D²⁷ – 71 (*c* 1.03, H₂O)

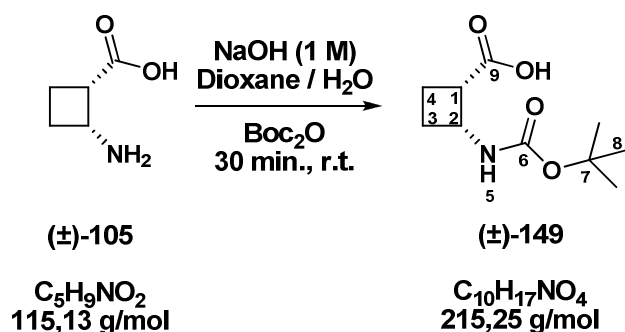
NMR ¹H (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 2.05 (m, 1H, H-4), 2.25 (m, 2H, H-4 and H-3), 2.35 (m, 1H, H-3), 3.22 (m, 1H, H-1), 3.92 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-2).

NMR ¹³C (DMSO-*d*₆) δ (ppm) : 21.1, 24.9, 41.3, 45.4, 180.9.

HPLC retention time: 10.9 min, ee > 97%.

Other data: as for **(±)-105**, page 184

(±)-cis-2-[(*tert*-butoxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylic Acid (±)-149



To a solution of **(±)-105** (3.281 g, 28.5 mmol) in a mixture of dioxane – 1 M NaOH (130 mL, 2:1, v/v) at 0 °C was added Boc₂O (6.837 g, 31.3 mmol). The solution was stirred at 0 °C for 5 min then at r.t. for 30 min. Solvents were evaporated and H₂O (15 mL) was added, followed by acidification to pH 1 by addition of 1 M HCl. The aqueous mixture was extracted with EtOAc (3 × 100 mL) and the combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered, and evaporated to give **(±)-149** as a white powder (6.134 g, 28.5 mmol).

Yield = 100 %

TLC *R_f* = 0.60 (EtOAc)

MP = 169-172 °C

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3347, 2985, 1696, 1685, 1516.

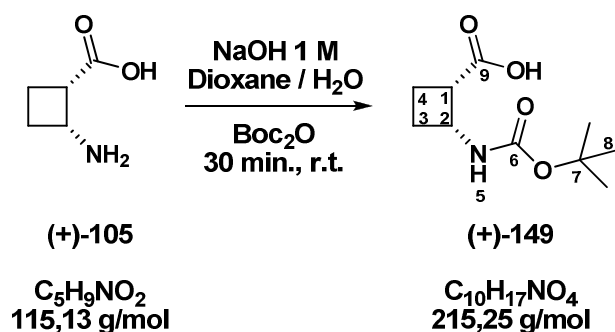
NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9 H, H-8), 1.82 (m, 1H, H-4), 2.09 (m, 1H, H-4), 2.33 (m, 2H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-1), 4.35 (qu, *J* = 8.6 Hz, 1H, H-2), 7.22 (bs, 1H, NH).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 16.7 (CH₂, C-4), 27.7 (3 CH₃, C-8), 28.1 (CH₂, C-3), 45.9 (CH, C-2), 47.3 (CH, C-1), 81.3 (C, C-7), 157.6 (C=O, C-6), 177.0 (C=O, C-9).

HR-MS : *m/z* calcd for [C₁₀H₁₇NO₄+Na]⁺ 237.106 ; found 237.105 (+ 1.0 ppm)

Anal. : calcd for C₁₀H₁₇NO₄ : C, 55.80 ; H, 7.96 ; N, 6.51 ; found C, 55.31 ; H, 7.86 ; N, 6.57

(+)-*cis*-2-(*tert*-Butyloxycarbonyl)aminocyclobutanecarboxylic Acid (+)-149



To a solution of **(+)-105** (1.08 g, 9.38 mmol) in a mixture of dioxane – 1 M NaOH (40 mL, 2:1,v/v) at 0 °C was added Boc_2O (2.23 g, 10.6 mmol). The solution was stirred at 0 °C for 5 min then at rt for 30 min. Solvents were evaporated and H_2O (5 mL) was added, followed by acidification to pH 1 by addition of 1 M HCl. The aqueous mixture was extracted with EtOAc (3 × 35 mL) and the combined organic layers were dried (MgSO_4), filtered, and evaporated to give **(+)-149** as a white powder (1.81 g, 8.44 mmol).

Yield = 90 %

MP = 116-119 °C

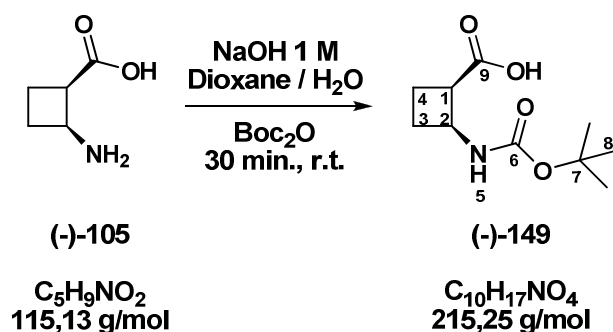
$[\alpha]_{\text{D}}^{27} + 48$ (*c* 0.85, CHCl_3)

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.45 (s, 9 H, H-8), 1.82 (m, 1H, H-4), 2.09 (m, 1H, H-4), 2.33 (m, 2H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-1), 4.35 (qu, J = 8.6 Hz, 1H, H-2), 7.22 (bs, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 16.7 (CH_2 , C-4), 27.7 (3 CH_3 , C-8), 28.1 (CH_2 , C-3), 45.9 (CH, C-2), 47.3 (CH, C-1), 81.3 (C, C-7), 157.6 (C=O, C-6), 177.0 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-149**, page 200

(–)-*cis*-2-(*tert*-Butyloxycarbonyl)aminocyclobutanecarboxylic Acid (–)-149



To a solution of **(–)-105** (0.39 g, 3.38 mmol) in a mixture of dioxane–1 M NaOH (10 mL, 2:1, v/v) at 0 °C was added Boc_2O (0.83 g, 3.98 mmol). The solution was stirred at 0 °C for 5 min then at rt for 30 min. Solvents were evaporated and H_2O (5 mL) was added, followed by acidification to pH 1 by addition of 1 M HCl. The aqueous mixture was extracted with EtOAc (3 × 15 mL) and the combined organic layers were dried (MgSO_4), filtered, and evaporated to give **(–)-149** as a white powder (0.70 g, 3.26 mmol).

Yield = 96 %

MP = 116–119 °C

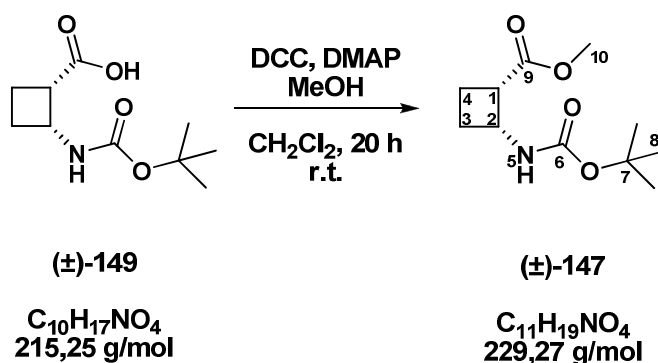
$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ - 47 (*c* 0.90, CHCl_3)

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.45 (s, 9 H, H-8), 1.82 (m, 1H, H-4), 2.09 (m, 1H, H-4), 2.33 (m, 2H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-1), 4.35 (qu, J = 8.6 Hz, 1H, H-2), 7.22 (bs, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 16.7 (CH_2 , C-4), 27.7 (3 CH_3 , C-8), 28.1 (CH_2 , C-3), 45.9 (CH, C-2), 47.3 (CH, C-1), 81.3 (C, C-7), 157.6 (C=O, C-6), 177.0 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-149**, page 200

Methyl (±)-*cis*-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (±)-147



To a solution of **(±)-149** (2.95 g, 13.7 mmol) in dry CH_2Cl_2 (150 mL) under argon, were added DMAP (0.180 g, 1.5 mmol) then MeOH (1.79 mL, 44.2 mmol). After cooling at 0 °C in an ice bath, DCC (2.95 g, 14.9 mmol) was introduced and the stirring was maintained at 0 °C for 5 min then at rt for 20 h. Evaporation of solvent under reduced pressure left a slightly brown solid that was purified by chromatography (EtOAc/cyclohexane, 90:10) to afford **(±)-147** as a white powder (2.91 g, 12.7 mmol).

Yield = 93 %

TLC R_f = 0.70 (EtOAc/cyclohexane, 60:40)

MP = 46-48 °C

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3337, 1685, 1676, 1527.

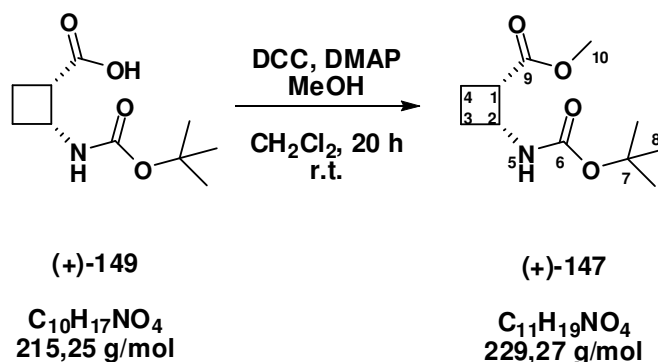
NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.44 (s, 9 H, H-8), 1.95 (m, 2H, H-4), 2.19 (qu, J = 10 Hz, 1H, H-3), 2.33 (m, 1H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-1), 3.69 (s, 3H, H-10), 4.45 (t, J = 7.0 Hz, 1H, H-2), 5.33 (br s, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.5 (CH_2 , C-3), 28.3 (CH_2 , C-4), 29.5 (3 CH_3 , C-8), 45.2 (CH , C-2), 45.8 (CH , C-1), 51.7 (CH_3 , C-10), 79.3 (C, C-7), 154.7 (C=O, C-6), 174.7 (C=O, C-9).

HR-MS : m/z calcd for $[\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4 + \text{Na}]^+$ 252.121 ; found 252.120 (+ 0.7 ppm)

Anal. : calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: C, 57.62 ; H, 8.35 ; N, 6.11 ; found C, 57.96 ; H, 8.20 ; N, 6.13

Methyl (+)-*cis*-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (+)-147



To a solution of **(+)-149** (1.06 g, 4.87 mmol) in dry CH_2Cl_2 (53 mL) under argon, were added DMAP (0.06 g, 0.50 mmol) then MeOH (0.43 g, 0.64 mL, 63.6 mmol). After cooling at 0 °C in an ice bath, DCC (1.06 g, 5.30 mmol) was introduced and the stirring was maintained at 0 °C for 5 min then at rt for 20 h. Evaporation of solvent under reduced pressure left a slightly brown solid that was purified by chromatography (EtOAc/cyclohexane, 90:10) to afford **(+)-147** as a white powder (0.98 g, 4.27 mmol).

Yield = 87 %

MP = 44-46 °C

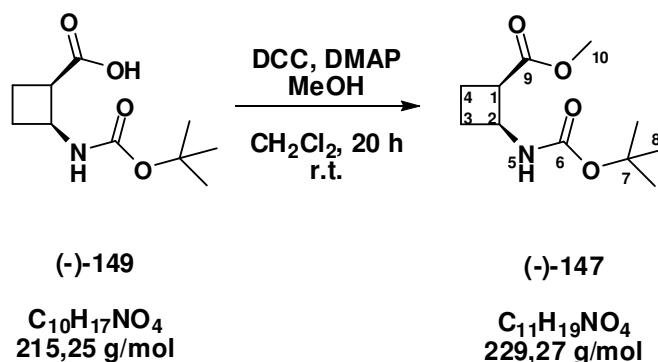
$[\alpha]_{\text{D}}^{27} + 122$ (*c* 1.17, CHCl_3)

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.44 (s, 9 H, H-8), 1.95 (m, 2H, H-4), 2.19 (qu, J = 10 Hz, 1H, H-3), 2.33 (m, 1H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-1), 3.69 (s, 3H, H-10), 4.45 (t, J = 7.0 Hz, 1H, H-2), 5.33 (br s, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.5 (CH_2 , C-3), 28.3 (CH_2 , C-4), 29.5 (3 CH_3 , C-8), 45.2 (CH, C-2), 45.8 (CH, C-1), 51.7 (CH_3 , C-10), 79.3 (C, C-7), 154.7 (C=O, C-6), 174.7 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-147**, page 203

Methyl (–)-*cis*-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (–)-147



To a solution of (–)-**149** (0.66 g, 3.05 mmol) in dry CH_2Cl_2 (35 mL) under argon, were added DMAP (0.04 g, 0.26 mmol) then MeOH (0.26 g, 0.39 mL, 8.12 mmol). After cooling at 0 °C in an ice bath, DCC (0.66 g, 3.28 mmol) was introduced and the stirring was maintained at 0 °C for 5 min then at rt for 20 h. Evaporation of solvent under reduced pressure left a slightly brown solid that was purified by chromatography (EtOAc/cyclohexane, 90:10) to afford (–)-**147** as a white powder (0.42 g, 1.83 mmol).

Yield = 60 %

MP = 44-46 °C

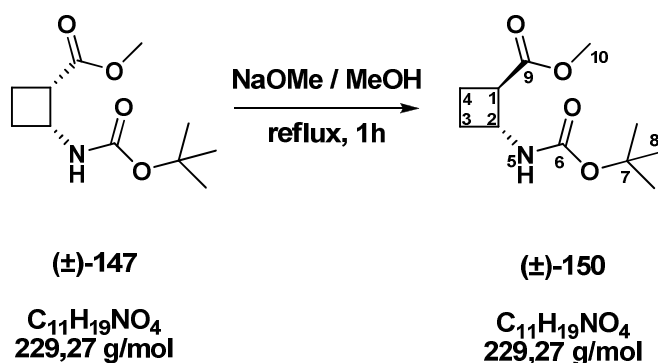
$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ - 122 (*c* 1.09, CHCl_3)

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.44 (s, 9 H, H-8), 1.95 (m, 2H, H-4), 2.19 (qu, J = 10 Hz, 1H, H-3), 2.33 (m, 1H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-1), 3.69 (s, 3H, H-10), 4.45 (t, J = 7.0 Hz, 1H, H-2), 5.33 (br s, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.5 (CH_2 , C-3), 28.3 (CH_2 , C-4), 29.5 (3 CH_3 , C-8), 45.2 (CH, C-2), 45.8 (CH, C-1), 51.7 (CH_3 , C-10), 79.3 (C, C-7), 154.7 (C=O, C-6), 174.7 (C=O, C-9).

Other data: as for (±)-**147**, page 203

Methyl (±)-*trans*-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (±)-150



Na (0.070 g, 3.04 mmol) was dissolved in dry MeOH (26 mL) at rt under argon. Compound **(±)-147** (0.13 g, 0.55 mmol) was added to the resulting solution and the mixture was stirred at reflux for 1h. After cooling in an ice bath, the reaction was quenched by cautious addition of 1 M HCl (5 mL). Excess MeOH was evaporated under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 20 mL). The combined organic layers were dried with MgSO_4 , filtered and evaporated. The crude was purified by chromatography (EtOAc/cyclohexane, 10:90) to afford **(±)-150** as a white powder (0.06 g, 0.26 mmol).

Yield = 47 %

TLC R_f = 0.50 (EtOAc/cyclohexane, 70:30)

MP = 73-75 °C

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3422, 1669, 1636, 1525.

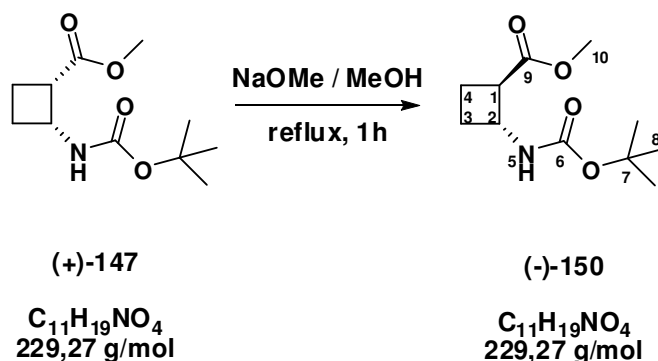
NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.43 (s, 9 H, H-8), 1.93 (m, 3H, H-4, H-3), 2.25 (dq, J = 8.0 and 2.0 Hz, 1H, H-3), 2.98 (m, 1H, H-1), 3.67 (s, 3H, H-10), 4.21 (m, 1H, H-2), 4.77 (br s, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.2 (CH_2 , C-3), 27.3 (CH_2 , C-4), 28.3 (3 CH_3 , C-8), 46.8 (CH, C-2), 48.9 (CH, C-1), 51.7 (CH_3 , C-10), 79.3 (C, C-7), 154.6 (C=O, C-6), 173.4 (C=O, C-9).

HR-MS : m/z calcd for $[\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4 + \text{Na}]^+$ 252.120 ; found 252.121 (+ 1.0 ppm)

Anal. : calcd for $\text{C}_{11}\text{H}_{19}\text{NO}_4$: C, 57.62 ; H, 8.35 ; N, 6.11 ; found C, 57.78 ; H, 8.42 ; N, 6.11

Methyl (–)-*trans*-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (–)-150



Na (0.450 g, 19.6 mmol) was dissolved in dry MeOH (168 mL) at rt under argon. Compound **(+)-147** (0.84 g, 3.66 mmol) was added to the resulting solution and the mixture was stirred at reflux for 1 h. After cooling in an ice bath, the reaction was quenched by cautious addition of 1 M HCl (34 mL). Excess MeOH was evaporated under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with EtOAc (2 x 80 mL). The combined organic layers were dried (MgSO_4), filtered and evaporated to give a white solid that was purified by chromatography (EtOAc/cyclohexane, 10:90) to afford **(–)-150** as a white powder (0.34 g, 1.50 mmol).

Yield = 41 %

MP = 73–75 °C

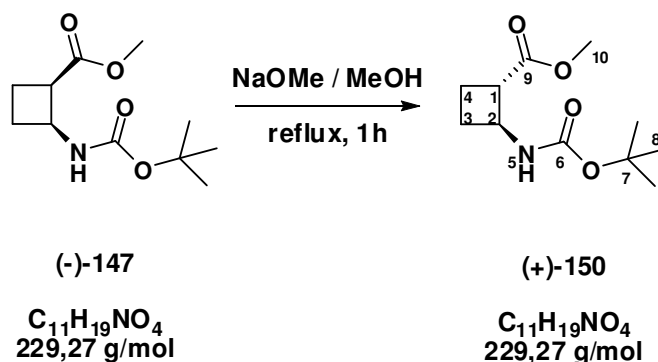
$[\alpha]_D^{27}$ – 55 (*c* 0.97, CHCl_3)

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.43 (s, 9 H, H-8), 1.93 (m, 3H, H-4, H-3), 2.25 (dq, J = 8.0 and 2.0 Hz, 1H, H-3), 2.98 (m, 1H, H-1), 3.67 (s, 3H, H-10), 4.21 (m, 1H, H-2), 4.77 (br s, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.2 (CH_2 , C-3), 27.3 (CH_2 , C-4), 28.3 (3 CH_3 , C-8), 46.8 (CH, C-2), 48.9 (CH, C-1), 51.7 (CH_3 , C-10), 79.3 (C, C-7), 154.6 (C=O, C-6), 173.4 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-150**, page 206

Methyl (+)-*trans*-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (+)-150



Na (0.190 g, 8.26 mmol) was dissolved in dry MeOH (85 mL) at rt under argon. Compound **(-)-147** (0.420 g, 1.83 mmol) was added to the resulting solution and the mixture was stirred at reflux for 1h. After cooling in an ice bath, the reaction was quenched by cautious addition of 1 M HCl (17 mL). Excess MeOH was evaporated under reduced pressure and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 40 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered and evaporated to give a white solid that was purified by chromatography (EtOAc/cyclohexane, 10:90) to afford **(+)-150** as a white powder (0.250 g, 1.09 mmol)

Yield = 60 %

MP = 73-75 °C

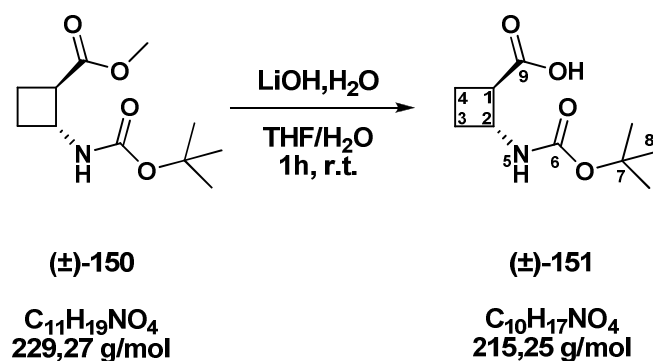
[α]_D²⁷ + 54 (*c* 1.07, CHCl₃)

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.43 (s, 9 H, H-8), 1.93 (m, 3H, H-4, H-3), 2.25 (dq, *J* = 8.0 and 2.0 Hz, 1H, H-3), 2.98 (m, 1H, H-1), 3.67 (s, 3H, H-10), 4.21 (m, 1H, H-2), 4.77 (br s, 1H, NH).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.2 (CH₂, C-3), 27.3 (CH₂, C-4), 28.3 (3 CH₃, C-8), 46.8 (CH, C-2), 48.9 (CH, C-1), 51.7 (CH₃, C-10), 79.3 (C, C-7), 154.6 (C=O, C-6), 173.4 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-150**, page 206

(±)-trans-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylic Acid (±)-151



At rt, LiOH, H₂O (0.017 g, 0.40 mmol) was added to a solution of **(±)-150** (0.092 g, 0.40 mmol) in THF–H₂O (1:1, 8 mL). The mixture was stirred 1h and the solvent was evaporated. Successively, H₂O (4 mL) and 1 M HCl (1 mL) were added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 10 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered, and evaporated giving compound **(±)-151** as a white powder (0.086 g, 0.40 mmol).

Yield = 100 %

TLC *R_f* = 0.60 (EtOAc)

MP = 155-157 °C

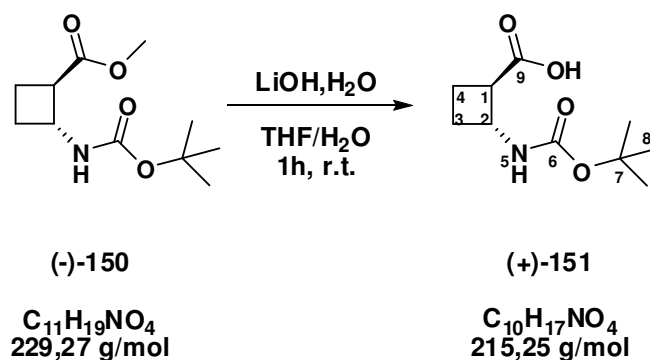
IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3372, 2989, 1702, 1527.

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9H, H-8), 1.79 (qu, *J* = 10 Hz, 1H, H-4), 2.20 (m, 3H, H-3, H-4), 3.13 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.10 (m, 1H, H-2), 5.05 (bs, 1H, NH).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.6 (CH₂, C-3), 23.7 (CH₂, C-4), 28.2 (3 CH₃, C-8), 47.8 (CH, C-2), 48.7 (CH, C-1), 82.0 (C, C-7), 157.3 (C=O, C-6), 174.3 (C=O, C-9).

HR-MS : *m/z* calcd for [C₁₀H₁₇NO₄+Na]⁺ 238.106 ; found 238.107 (+ 0.4 ppm)

(+)-(1*R*,2*R*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxylic acid (+)-(1*R*,2*R*)-151



At rt, LiOH, H₂O (0.055 g, 1.31 mmol) was added to a solution of **(-)-150** (0.300 g, 1.31 mmol) in THF–H₂O (1:1, 25 mL). The mixture was stirred 1h and the solvent was evaporated. Successively, H₂O (12 mL) and 1 M HCl (3.5 mL) were added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 30 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered, and evaporated giving compound **(+)-151** as a white powder (0.250 g, 1.16 mmol).

Yield = 88 %

MP = 155-157 °C

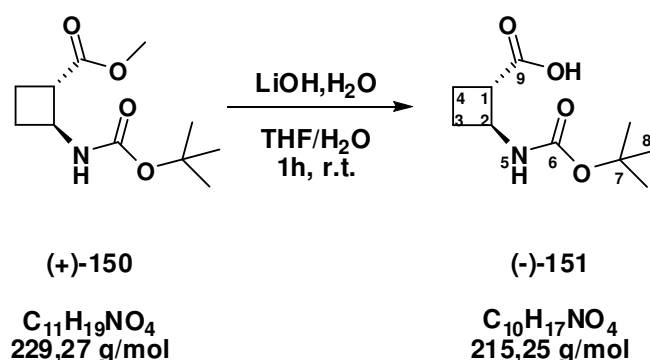
[α]_D²⁷ + 45 (*c* 1.05, CHCl₃)

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9H, H-8), 1.79 (qu, *J* = 10 Hz, 1H, H-4), 2.20 (m, 3H, H-3, H-4), 3.13 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.10 (m, 1H, H-2), 5.05 (bs, 1H, NH).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.6 (CH₂, C-3), 23.7 (CH₂, C-4), 28.2 (3 CH₃, C-8), 47.8 (CH, C-2), 48.7 (CH, C-1), 82.0 (C, C-7), 157.3 (C=O, C-6), 174.3 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-151**, page 209

(-)-(1*S*,2*S*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxylic acid (-)-(1*S*,2*S*)-151



At rt, LiOH, H₂O (0.046 g, 1.09 mmol) was added to a solution of **(+)-150** (0.250 g, 1.09 mmol) in THF–H₂O (1:1, 30 mL). The mixture was stirred 1h and the solvent was evaporated. Successively, H₂O (10 mL) and 1 M HCl (2.5 mL) were added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined organic layers were dried (MgSO₄), filtered, and evaporated giving compound **(-)-151** as a white powder (0.234 g, 1.09 mmol).

Yield = 100 %

MP = 155-157 °C

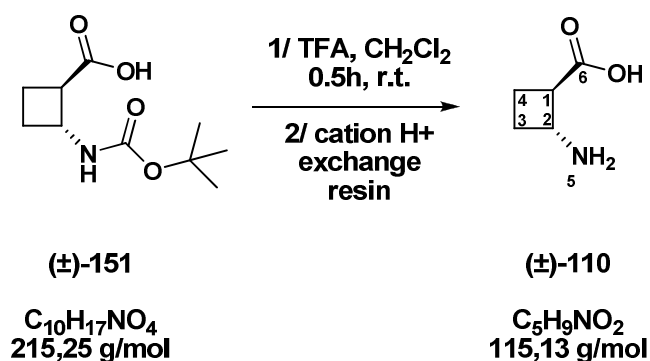
[α]_D²⁷ - 44 (*c* 0.52, CHCl₃)

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9 H, H-8), 1.79 (qu, *J* = 10 Hz, 1 H, H-4), 2.20 (m, 3H, H-3, H-4), 3.13 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-1), 4.10 (m, 1H, H-2), 5.05 (br s, 1H, NH).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.6 (CH₂, C-3), 23.7 (CH₂, C-4), 28.2 (3 CH₃, C-8), 47.8 (CH, C-2), 48.7 (CH, C-1), 82.0 (C, C-7), 157.3 (C=O, C-6), 174.3 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-151**, page 209

(±)-trans-2-Aminocyclobutanecarboxylic Acid (±)-110



To a solution of compound **(±)-151** (0.086 g, 0.40 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL) was added dropwise TFA (1 mL, 13.4 mmol). The solution was stirred 30 min, then evaporated under reduced pressure to afford a brown solid, which was dissolved in H_2O (2 mL). The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 50WX8-100, H^+ , 50–100 mesh). The column was washed with H_2O until the eluent was neutral, then the product was eluted with 1 M NH_4OH . After pooling and evaporation of appropriate fractions, pure **(±)-110** was obtained as a white solid (0.039 g, 0.34 mmol).

Yield = 85 %

TLC R_f = 0.30 (PrOH/ H_2O , 90:10).

MP = 151–154 °C

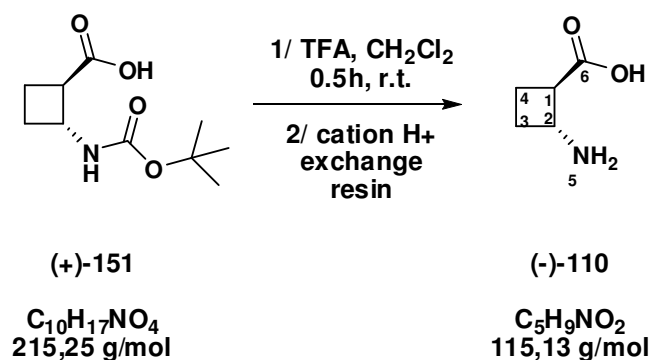
IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3449, 2989, 1560, 1415.

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.90 (qu, J = 9.8 Hz, 1H, H-4), 2.02 (qu, J = 9.2 Hz, 1H, H-4), 2.22 (q, J = 9.1 Hz, 2H, H-3), 3.13 (q, J = 9.3 Hz, 1H, H-1), 3.88 (q, J = 8.0 Hz, 1H, H-2).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 19.8 (CH_2 , C-3), 22.6 (CH_2 , C-4), 45.7 (CH, C-2), 47.6 (CH, C-1), 180.4 (C=O, C-6).

HR-MS : m/z calcd for $[\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NO}_2 + \text{H}]^+$ 116.071; found 116.072 (+ 0.7 ppm)

(-)-*trans*-2-Aminocyclobutanecarboxylic Acid (-)-110



To a solution of compound **(+)-151** (0.24 g, 1.11 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise TFA (4.30 g, 3 mL, 36.6 mmol). The solution was stirred 30 min, then evaporated under reduced pressure to afford a brown solid, which was dissolved in H₂O (5 mL). The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 50WX8-100, H⁺, 50–100 mesh). The column was washed with H₂O until the eluent was neutral, then the product was eluted with 1 M NH₄OH. After pooling and evaporation of appropriate fractions, pure **(-)-110** was obtained as a white solid (0.10 g, 0.87 mmol).

Yield = 78 %

MP = 151-154 °C

[α]_D²² - 99 (c 0.52, H₂O).

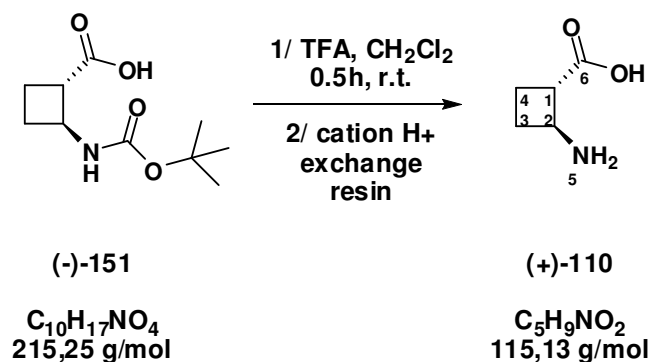
NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.90 (qu, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-4), 2.02 (qu, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-4), 2.22 (q, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-3), 3.13 (q, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-1), 3.88 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 19.8 (CH₂, C-3), 22.6 (CH₂, C-4), 45.7 (CH, C-2), 47.6 (CH, C-1), 180.4 (C=O, C-6).

HPLC retention time: 21.2 min, ee > 97%.

Other data: as for **(±)-110**, page 212

(+)-*trans*-2-Aminocyclobutanecarboxylic Acid (+)-110



To a solution of compound **(-)-151** (0.22 g, 1.02 mmol) in dry CH₂Cl₂ (5 mL) was added dropwise TFA (3.97 g, 2.6 mL, 34.8 mmol). The solution was stirred 30 min, then evaporated under reduced pressure to afford a brown solid, which was dissolved in H₂O (5 mL). The solution was deposited on a cation-exchange column (Dowex 50WX8-100, H⁺, 50–100 mesh). The column was washed with H₂O until the eluent was neutral, then the product was eluted with 1 M NH₄OH. After pooling and evaporation of appropriate fractions, pure **(+)-110** was obtained as a white solid (0.103 g, 0.90 mmol).

Yield = 88 %

MP = 151-154 °C

[α]_D²² + 99 (*c* 0.39, H₂O).

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.90 (qu, *J* = 9.8 Hz, 1H, H-4), 2.02 (qu, *J* = 9.2 Hz, 1H, H-4), 2.22 (q, *J* = 9.1 Hz, 2H, H-3), 3.13 (q, *J* = 9.3 Hz, 1H, H-1), 3.88 (q, *J* = 8.0 Hz, 1H, H-2).

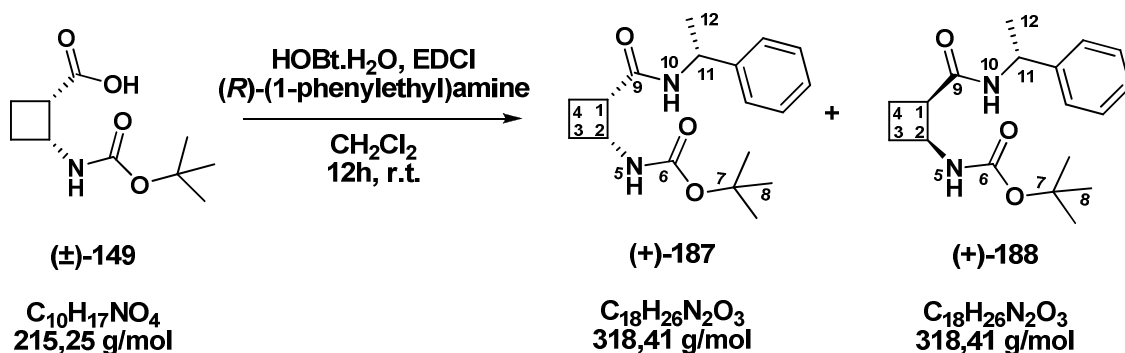
NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 19.8 (CH₂, C-3), 22.6 (CH₂, C-4), 45.7 (CH, C-2), 47.6 (CH, C-1), 180.4 (C=O, C-6).

HPLC retention time: 12.5 min, ee > 97%.

Other data: as for **(±)-110**, page 212

(+)-*N*-(11-phenyl)ethyl-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxamide

(+)-187 and (+)-188



To a solution of **(±)-149** (1.978 g, 9.19 mmol) in dry CH_2Cl_2 (170 mL) at 0 °C under argon were added 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (1.958 g, 12.8 mmol) and *(R)*-(1-phenylethyl)amine **(–)-10** (1.223 g, 10.1 mmol). After 10 min, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride (2.626 g, 13.7 mmol) was added and the cooling bath was removed; the mixture was stirred at rt for 12h, then washed with 5 % citric acid solution (170 mL) then with saturated $NaHCO_3$ solution (170 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtered and evaporated. Flash chromatography (EtOAc/cyclohexane 15:85) of the residue furnished **(+)-187** (1.258 g, 3.95 mmol) and **(+)-188** (1.229 g, 3.86 mmol).

(+)-187

Yield = 43 %

TLC R_f = 0.28 (EtOAc /cyclohexane, 30:70)

MP = 162-164 °C

$[\alpha]_D^{27} + 134$ (c 0.56 , $CHCl_3$).

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3361, 1681, 1647, 1542

NMR 1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1.43 (s, 9H, H-8), 1.47 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H-12), 1.89 (m, 1H, H-4), 2.05 (m, 1H, H-4), 2.25 (m, 1H, H-3), 2.31 (m, 1H, H-3), 3.16 (m, 1H, H-1), 4.41 (m, 1H, H-2), 5.13 (dq, J = 7.2 and 7.0 Hz, 1H, H-11), 5.37 (bs, 1H, H-5), 5.79 (bs, 1H, H-10), 7.23-7.35 (m, 5H, H_{arom}).

NMR ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 18.1 (CH_2 , C-4), 22.0 (CH_3 , C-12), 28.4 (3 CH_3 , C-8), 29.3 (CH_2 , C-3), 46.2 (CH, C-2), 46.7 (CH, C-1), 48.7 (CH, C-11), 79.4 (C, C-7), 126.1 (2 CH, C_{arom}), 127.4 (CH, C_{arom}), 128.7 (2 CH, C_{arom}), 143.1 (C_{ipso}), 155.3 (C=O, C-6), 171.8 (C=O, C-9).

HR-MS : m/z calcd for $[C_{18}H_{26}N_2O_3+Na]^+$ 341.1841 ; found 341.1851 (+ 2.9 ppm)

Anal. : calcd for $C_{18}H_{26}N_2O_3$: C, 67.90 ; H, 8.23 ; N, 8.80 ; found C, 67.65 ; H, 8.42 ; N, 9.10

(+)-188

Yield = 42 %

TLC R_f = 0.21 (EtOAc/cyclohexane, 30:70)

MP = 124-126 °C

$[\alpha]_D^{27}$ + 6.0 (c 0.50, CHCl₃).

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3375, 1682, 1644, 1531

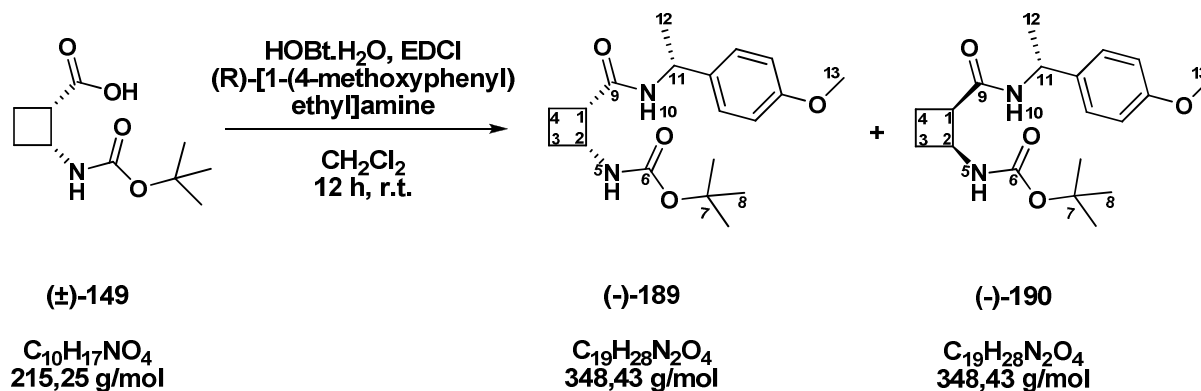
NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.36 (s, 9H, H-8), 1.48 (d, J = 7.0 Hz, 3H, H-12), 1.88 (m, 1H, H-4), 2.04 (m, 1H, H-4), 2.29 (m, 2H, H-3), 3.16 (m, 1H, H-1), 4.43 (qu, J = 8.8 Hz, 1H, H-2), 5.11 (dq, J = 7.1 and 7.0 Hz, 1H, H-11), 5.33 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-5), 5.77 (br s, 1H, H-10), 7.23-7.33 (m, 5H, H_{arom}).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.3 (CH₂, C-4), 21.9 (CH₃, C-12), 28.3 (3 CH₃, C-8), 29.9 (CH₂, C-3), 46.1 (CH, C-2), 46.8 (CH, C-1), 49.0 (CH, C-11), 79.3 (C, C-7), 126.1 (2 CH, C_{arom}), 127.3 (CH, C_{arom}), 128.7 (2 CH, C_{arom}), 143.2 (C_{ipso}), 155.1 (C=O, C-6), 172.3 (C=O, C-9).

HR-MS : m/z calcd for [C₁₈H₂₆N₂O₃+Na]⁺ 341.1841 ; found 341.1849 (+0.2 ppm)

Anal. : calcd for C₁₈H₂₆N₂O₃ : C, 67.90 ; H, 8.23 ; N, 8.80 ; found C, 67.60 ; H, 8.38 ; N, 9.11

(-)-N-(11-*p*-methoxyphenyl)ethyl-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxamide
(-)-189 and (-)-190



To a solution of **(±)-149** (2.50 g, 11.62 mmol) in dry CH_2Cl_2 (210 mL) at 0 °C under argon were added 1-hydroxybenzotriazole monohydrate (2.19 g, 16.2 mmol) and (*R*)- α -(*p*-methoxyphenyl)ethylamine **(-)-174** (1.86 g, 12.7 mmol). After 10 min, 1-(3-dimethylaminopropyl)-3-ethyl carbodiimide hydrochloride (3.33 g, 17.36 mmol) was added and the cooling bath was removed; the mixture was stirred at rt for 12h, then washed with 5 % citric acid solution (210 mL) then saturated $NaHCO_3$ solution (210 mL). The organic layer was dried ($MgSO_4$), filtrated and evaporated. Flash chromatography (EtOAc/cyclohexane 15:85) of the residue furnished **(-)-189** (1.700 g, 4.88 mmol) and **(-)-190** (1.658 g, 4.76 mmol).

(-)-189

Yield = 42 %

TLC R_f = 0.26 (EtOAc/cyclohexane 30:70)

MP = 139-142 °C

$[\alpha]_D^{27}$ – 111 (*c* 0.54 , $CHCl_3$)

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3344, 1683, 1640, 1534

NMR 1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1.43 (s, 9H, H-8), 1.45 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-12), 1.84 (m, 1H, H-4), 2.04 (m, 1H, H-4), 2.26 (m, 2H, H-3), 3.14 (m, 1H, H-1), 3.78 (s, 3H, H-13), 4.38 (m, 1H, H-2), 5.09 (dq, J = 7.2 and 7.0 Hz 1H, H-11), 5.38 (bs, 1H, H-5), 5.80 (bs, 1H, H-10), 6.86 (d, 2H, J = 8.7 Hz, $H_{arom.}$), 7.24 (d, 2H, J = 8.7 Hz, $H_{arom.}$).

NMR ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 18.1 (CH_2 , C-4), 21.9 (CH_3 , C-12), 28.4 (3 CH_3 , C-8), 29.2 (CH_2 , C-3), 46.2 (CH, C-2), 46.7 (CH, C-1), 48.1 (CH, C-11), 55.3 (CH_3 , C-13), 79.4 (C, C-7), 114.0 (2 CH, $C_{arom.}$), 127.3 (2 CH, $C_{arom.}$), 135.3 (C_{ipso}), 155.3 (C=O, C-6), 158.8 (C_{ipso}), 171.8 (C=O, C-9).

HR-MS : m/z calcd for $[C_{19}H_{28}N_2O_4+Na]^+$ 371.1947 ; found 371.1957 (+2.8 ppm)

Anal. : calcd for $C_{19}H_{28}N_2O_4$: C, 65.49 ; H, 8.10 ; N, 8.04 ; found C, 65.97 ; H, 8.18 ; N, 8.28

(-)-190

Yield = 41 %

TLC R_f = 0.20 (EtOAc/cyclohexane, 30:70)

MP = 121-123 °C

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3368, 1686, 1645, 1528

$[\alpha]_D^{27}$ – 17.9 (c 0.54, $CHCl_3$)

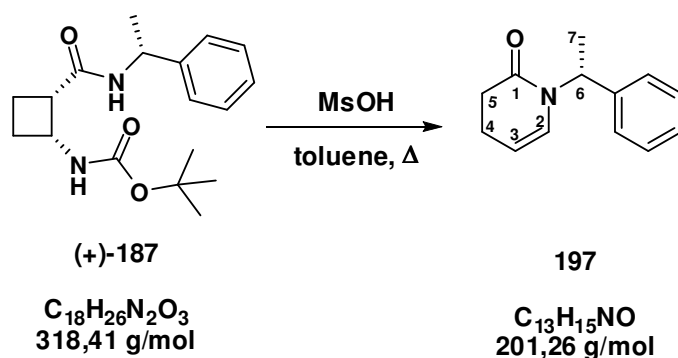
NMR 1H ($CDCl_3$) δ (ppm) : 1.35 (s, 9H, H-8), 1.45 (d, J = 6.9 Hz, 3H, H-12), 1.87 (m, 1H, H-4), 2.02 (m, 1H, H-4), 2.28 (m, 2H, H-3), 3.14 (m, 1H, H-1), 3.78 (s, 3H, H-13), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.05 (dq, J = 7.1 and 7.0 Hz, 1H, H-11), 5.38 (bs, 1H, H-5), 5.78 (bs, 1H, H-10), 6.84 (d, 2H, J = 8.7 Hz, $H_{arom.}$), 7.24 (d, 2H, J = 8.7 Hz, $H_{arom.}$).

NMR ^{13}C ($CDCl_3$) δ (ppm) : 18.4 (CH_2 , C-4), 21.8 (CH_3 , C-12), 28.3 (3 CH_3 , C-8), 29.9 (CH_2 , C-3), 46.0 (CH , C-2), 46.8 (CH , C-1), 48.4 (CH , C-11), 55.3 (CH_3 , C-13), 79.3 (C, C-7), 114.0 (2 CH , $C_{arom.}$), 127.3 (2 CH , $C_{arom.}$), 135.3 (C_{ipso}), 155.1 (C=O, C-6), 158.7 (C_{ipso}), 172.2 (C=O, C-9).

HR-MS : m/z calcd for $[C_{19}H_{28}N_2O_4+Na]^+$ 371.1947 ; found 371.1929 (-1.8 ppm)

Anal. : calcd for $C_{19}H_{28}N_2O_4$: C, 65.49 ; H, 8.10 ; N, 8.04 ; found C, 65.87 ; H, 8.14 ; N, 8.33

(R)-1-(1-phenylethyl)-3,4-dihydropyridin-2(1H)-one 197



Methane sulfonic acid (10.2 μ L, 0.016 mmol) was added carefully to a solution of **(+)-187** (0.050 g, 0.016 mmol) in dry toluene (7 mL), and the mixture was refluxed 1h. The solvent was then evaporated and the crude was purified by chromatography using cyclohexane/EtOAc (9:1) as eluent to give **197** as a brown solid (0.021 g, 0.010 mmol);

Yield = 62 %

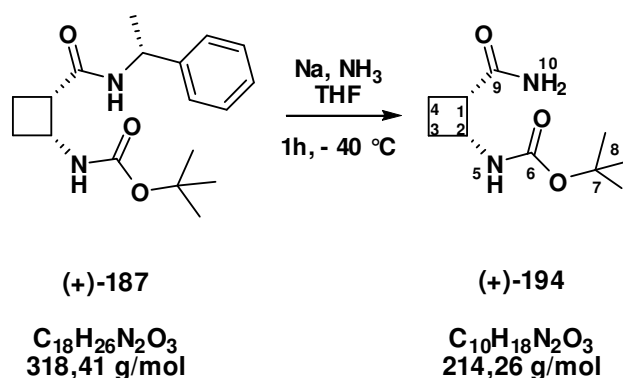
TLC R_f = 0.77 (EtOAc/cyclohexane, 2:8)

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.54 (d, J = 7.1 Hz, 3H, H-7), 2.29 (m, 2H, H-4), 2.58 (t, J = 8.0 Hz, 1H, H-5), 5.11 (dt, J = 7.9 and 4.3 Hz, 1H, H-3), 5.87 (td, J = 7.9 and 1.6 Hz, H-2), 6.02 (q, J = 7.1 Hz, H-6), 7.24-7.36 (m, 5H, H_{arom}).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 17.4 (CH₃, C-7), 20.0 (CH₂, C-4), 31.7 (CH₂, C-5), 49.4 (CH, C-6), 106.8 (CH, C-3), 125.6 (CH, C-2), 127.1 (CH, C_{arom}), 127.4 (CH, C_{arom}), 128.5 (CH, C_{arom}), 140.7 (C, C_{ipso}), 169 (C=O, C-1).

This compound has been described in the literature: *Heterocycles* **1990**, 8, 1525-1535.

(+)-(1*S*,2*R*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutane-carboxamide (+)-(1*S*,2*R*)-194



Sodium shot (0.503 g, 21.9 mmol) was added under a stream of argon to liquid ammonia (53 mL) at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solution of amide **(+)-187** (0.998 g, 3.13 mmol) in THF (30 mL) was added, and the mixture was stirred at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1h. then quenched by addition of solid NH_4Cl (1.760 g, 32.9 mmol), and allowed to warm to rt as the ammonia evaporated. Water (30 mL) was added to the residual solution, then 1 M HCl was added slowly until pH = 7. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 ($3 \times 45\text{ mL}$), and combined organic extracts were dried with dry MgSO_4 , filtered and evaporated. Flash chromatography (EtOAc/cyclohexane 50:50) provided **(+)-194** as a white powder (0.537 g, 2.51 mmol).

Yield = 80 %

TLC R_f = 0.43 (EtOAc)

$[\alpha]_D^{27} + 133$ (c 0.55, CHCl_3).

MP = 167-169 $^{\circ}\text{C}$

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3404, 3361, 3226, 2980, 1682, 1624, 1514

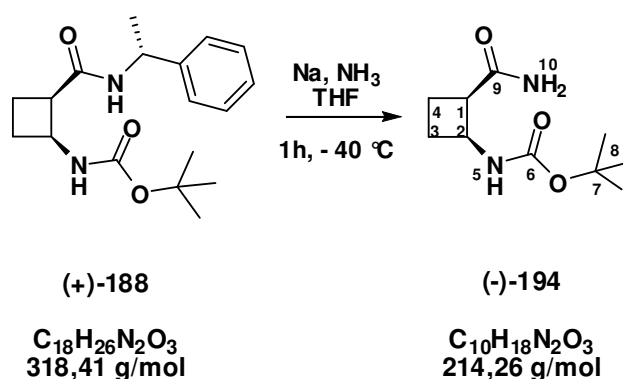
NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.40 (s, 9H, H-8), 1.90 (m), 2.10 (m, 1H, H-4), 2.21 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-3), 3.29 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.40 (bs, 1H, H-5), 5.51 (bs, 1H, H-10), 5.67 (bs, 1H, H-10).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.0 (CH_2 , C-4), 28.3 (3 CH_3 , C-8), 28.8 (CH_2 , C-3), 45.8 (CH , C-2), 46.3 (CH , C-1), 79.5 (C, C-7), 155.5 (C=O, C-6), 175.2 (C=O, C-9).

HR-MS : m/z calcd for $[\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3 + \text{Na}]^+$ 237.1215 ; found 237.1216 (+ 0.4 ppm)

Anal. : calcd for $\text{C}_{10}\text{H}_{18}\text{N}_2\text{O}_3$: C, 56.06 ; H, 8.47 ; N, 13.07 ; found C, 56.40 ; H, 8.26 ; N, 12.98

(-)-(1*R*,2*S*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxamide (-)-(1*R*,2*S*)-194



Sodium shot (0.333 g, 14.5 mmol) was added under a stream of argon to liquid ammonia (35 mL) at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$. A solution of amide **(+)-188** (0.668 g, 2.10 mmol) in THF (23 mL) was added, and the mixture was stirred at $-40\text{ }^{\circ}\text{C}$ for 1h. then quenched by addition of solid NH_4Cl (1.166 g, 21.8 mmol), and allowed to warm to rt as the ammonia evaporated. Water (20 mL) was added to the residual solution, then 1 M HCl was added slowly until pH = 7. The mixture was extracted with CH_2Cl_2 ($3 \times 30\text{ mL}$), and combined organic extracts were dried with dry MgSO_4 , filtered and evaporated. Flash chromatography (EtOAc/cyclohexane 50:50) provided **(-)-194** as a white powder (0.381 g, 1.78 mmol).

Yield = 85 %

$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ – 133 (*c* 0.52, CHCl_3).

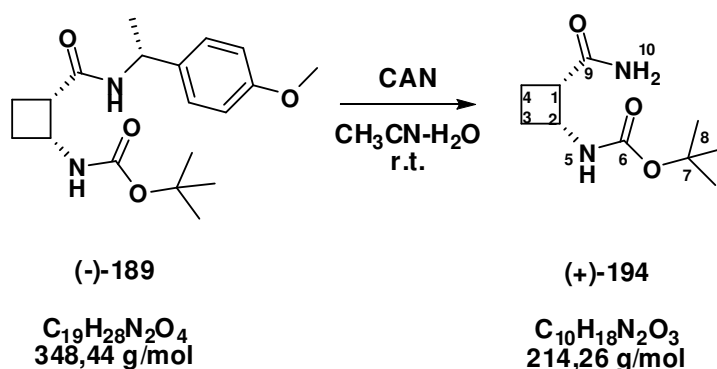
MP = 167-169 $^{\circ}\text{C}$

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.40 (s, 9H, H-8), 1.90 (m), 2.10 (m, 1H, H-4), 2.21 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-3), 3.29 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.40 (bs, 1H, H-5), 5.51 (bs, 1H, H-10), 5.67 (bs, 1H, H-10).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.0 (CH_2 , C-4), 28.3 (3 CH_3 , C-8), 28.8 (CH_2 , C-3), 45.8 (CH , C-2), 46.3 (CH , C-1), 79.5 (C, C-7), 155.5 (C=O, C-6), 175.2 (C=O, C-9).

Other data: as for **(+)-194**, page 220

(+)-(1*S*,2*R*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutane-carboxamide (+)-(1*S*,2*R*)-194



A solution of **(-)-189** (0.749 g, 2.15 mmol) and CAN (5.865 g, 10.7 mmol) in acetonitrile (75 mL) and water (20 mL) was stirred at rt until TLC analysis showed no remaining starting material (approx. 1h). The mixture was diluted with water (20 mL) and extracted with EtOAc (3 × 20 mL). The combined extracts were washed successively with saturated NaHCO_3 solution (6 mL) and water (10 mL), dried with MgSO_4 , then evaporated to give crude product. Flash chromatography (EtOAc/cyclohexane 50:50) provided **(+)-194** as a white powder (0.300 g, 1.40 mmol).

Yield = 65 %

MP = 167-169 °C

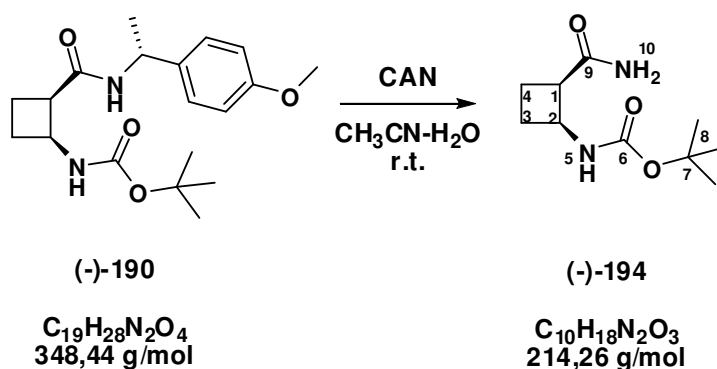
$[\alpha]_{\text{D}}^{27} + 133$ (*c* 0.39, CHCl_3).

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.40 (s, 9H, H-8), 1.90 (m), 2.10 (m, 1H, H-4), 2.21 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-3), 3.29 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.40 (bs, 1H, H-5), 5.51 (bs, 1H, H-10), 5.67 (bs, 1H, H-10).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.0 (CH_2 , C-4), 28.3 (3 CH_3 , C-8), 28.8 (CH_2 , C-3), 45.8 (CH , C-2), 46.3 (CH , C-1), 79.5 (C, C-7), 155.5 (C=O, C-6), 175.2 (C=O, C-9).

Other data: as for **(+)-194**, page 220

(-)-(1*R*,2*S*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxamide (-)-(1*R*,2*S*)-194



A solution of **(-)-190** (0.481 g, 1.38 mmol) and CAN (3.837 g, 7.00 mmol) in acetonitrile (60 mL) and water (15 mL) was stirred at rt until TLC analysis showed no remaining starting material (approx. 1h). The mixture was diluted with water (15 mL) and extracted with EtOAc (3 × 15 mL). The extracts were washed successively with saturated NaHCO₃ solution (3 mL) and water (5 mL), dried with MgSO₄, then evaporated to give crude product. Flash chromatography (EtOAc/cyclohexane 50:50) provided **(-)-194** as a white powder (0.120 g, 0.56 mmol).

Yield = 40 %

MP = 167-169 °C

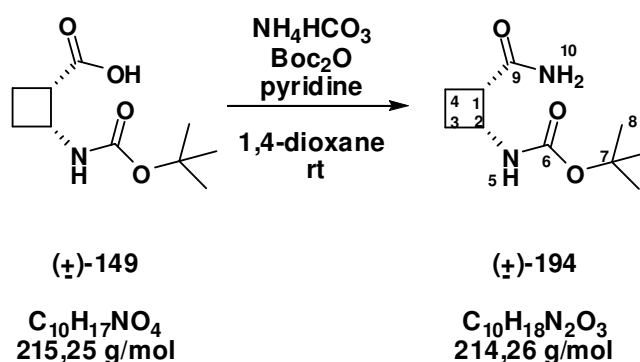
[α]_D²⁷ – 133 (*c* 0.5, CHCl₃).

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.40 (s, 9H, H-8), 1.90 (m), 2.10 (m, 1H, H-4), 2.21 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-3), 3.29 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.40 (bs, 1H, H-5), 5.51 (bs, 1H, H-10), 5.67 (bs, 1H, H-10).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.0 (CH₂, C-4), 28.3 (3 CH₃, C-8), 28.8 (CH₂, C-3), 45.8 (CH, C-2), 46.3 (CH, C-1), 79.5 (C, C-7), 155.5 (C=O, C-6), 175.2 (C=O, C-9).

Other data: as for **(+)-194**, page 220

(±)-*cis*-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxamide (±)-*cis*-194



To a solution of compound **(±)-149** (0.200 g, 0.93 mmol) in dioxane (20 mL) were added successively Boc₂O (0.321 g, 1.47 mmol), ammonium bicarbonate (0.207 g, 2.76 mmol) and pyridine (0.145 g, 1.83 mmol), and the mixture was stirred for 16 h at rt. The reaction mixture was diluted with water (15 mL) reduced by careful evaporation under reduced pressure. The solid product was washed with water (4 × 15 mL) and cyclohexane (4 × 15 mL), then dried under vacuum to give the crude product. Flash chromatography (EtOAc/cyclohexane 85:15) provided **(±)-194** as a white powder (0.189 g, 0.88 mmol).

Yield = 95 %

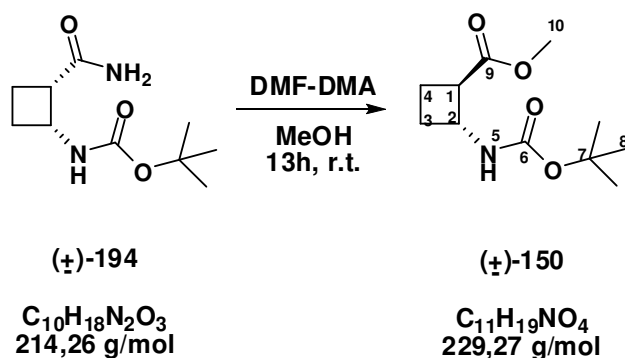
MP = 167-169 °C

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.40 (s, 9H, H-8), 1.90 (m), 2.10 (m, 1H, H-4), 2.21 (m, 1H, H-3), 2.32 (m, 1H, H-3), 3.29 (m, 1H, H-1), 4.40 (m, 1H, H-2), 5.40 (bs, 1H, H-5), 5.51 (bs, 1H, H-10), 5.67 (bs, 1H, H-10).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.0 (CH₂, C-4), 28.3 (3 CH₃, C-8), 28.8 (CH₂, C-3), 45.8 (CH, C-2), 46.3 (CH, C-1), 79.5 (C, C-7), 155.5 (C=O, C-6), 175.2 (C=O, C-9).

Other data: as for **(+)-194**, page 220

Methyl (±)-*trans*-2-[(*tert*-Butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylate (±)-150



To a solution of amide **(±)-194** (0.100 g, 0.47 mmol) in dry methanol (5 mL) was added Dimethylformamide-dimethylacetal (DMF-DMA) (0.17 g, 0.19 mL, 1.41 mmol) and the solution was stirred 13 h. at room temperature followed by 10 h. at 80 °C. Then, the reaction was quenched with a solution of hydrochloric acid 1 M. Methanol was evaporated and the solution was extracted with EtOAc (3 x 10 mL) The combined organic layers were purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (90:10) as eluent to afford **(±)-150** as a white powder (0.098 g, 0.43 mmol).

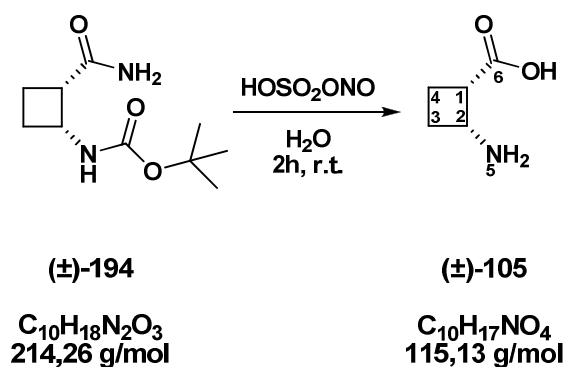
Yield = 91 %

NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.43 (s, 9 H, H-8), 1.93 (m, 3H, H-4, H-3), 2.25 (qd, J = 8 and 2 Hz, 1H, H-3), 2.98 (m, 1H, H-1), 3.67 (s, 3H, H-10), 4.21 (m, 1H, H-2), 4.77 (br s, 1H, NH).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.2 (CH_2 , C-3), 27.3 (CH_2 , C-4), 28.3 (3 CH_3 , C-8), 46.8 (CH , C-2), 48.9 (CH , C-1), 51.7 (CH_3 , C-10), 79.3 (C, C-7), 154.6 (C=O, C-6), 173.4 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-150**, page 206

(±)-*cis*-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (±)-105



Nitrosylsulfuric acid (40% solution in concentrated H₂SO₄; 0.45 mL) was added cautiously to water (0.18 mL) with chilling in an ice bath. Solid **(±)-194** (0.076 g, 0.355 mmol) was added, and the mixture was allowed to warm to rt over 2h. whilst being stirred. The reaction mixture was poured over crushed ice (1.2 g). After warming to rt, the solution was applied to an ion exchange column; elution provided **(±)-105** as a white powder (0.036 g, 0.312 mmol).

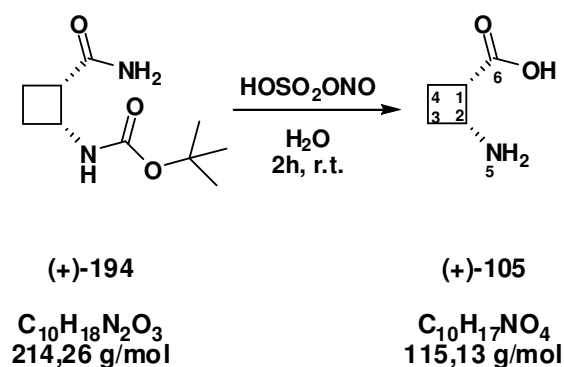
Yield = 88 %

NMR ¹H (D₂O) δ (ppm) : 2.05 (m, 1H, H-4), 2.22 (m, 2H, H-3 and H-4), 2.35 (m, 1H, H-3), 3.22 (m, 1H, H-1), 3.92 (q, *J* = 7.2 Hz, 1H, H-2).

NMR ¹³C (D₂O) δ (ppm) : 21.1 (CH₂, C-3), 24.6 (CH₂, C-4), 41.3 (CH, C-2), 45.4 (CH, C-1), 180.9 (C=O, C-6).

Other data: as for **(±)-105**, page 185

(+)-(1*S*,2*R*)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (+)-(1*S*,2*R*)-105



Nitrosylsulfuric acid (40% solution in concentrated H_2SO_4 ; 0.45 mL) was added cautiously to water (0.18 mL) which was chilled in an ice bath. Solid amide **(+)-194** (0.050 g, 0.233 mmol) was added, and the mixture was allowed to warm to rt over 2h. whilst being stirred. The reaction mixture was poured over crushed ice (1.2 g). After warming to rt, the solution was applied to an ion exchange column; elution provided **(+)-105** as a white powder (0.025 g, 0.208 mmol).

Yield = 93 %

$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ +70 (*c* 0.50, H_2O).

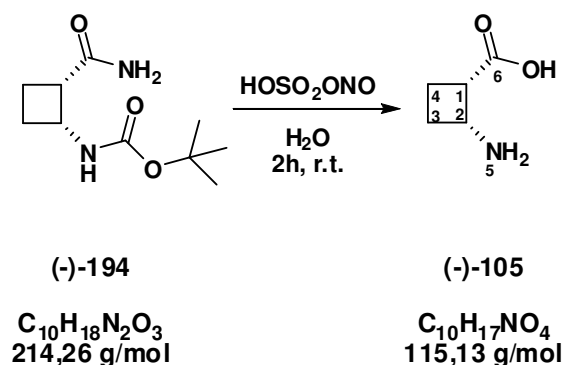
NMR ^1H (D_2O) δ (ppm) : 2.05 (m, 1H, H-4), 2.22 (m, 2H, H-3 and H-4), 2.35 (m, 1H, H-3), 3.22 (m, 1H, H-1), 3.92 (q, J = 7.2 Hz, 1H, H-2).

NMR ^{13}C (D_2O) δ (ppm) : 21.1 (CH_2 , C-3), 24.6 (CH_2 , C-4), 41.3 (CH, C-2), 45.4 (CH, C-1), 180.9 (C=O, C-6).

HPLC retention time: 7.2 min, ee > 97%.

Other data: as for **(±)-105**, page 185

(-)-(1*R*,2*S*)-2-aminocyclobutanecarboxylic acid (-)-(1*R*,2*S*)-105



Nitrosylsulfuric acid (40% solution in concentrated H_2SO_4 ; 0.45 mL) was added cautiously to water (0.18 mL) which was chilled in an ice bath. Solid amide **(-)-194** (0.050 g, 0.233 mmol) was added, and the mixture was allowed to warm to rt over 2h. whilst being stirred. The reaction mixture was poured over crushed ice (1.2 g). After warming to rt, the solution was applied to an ion exchange column; elution provided **(-)-105** as a white powder (0.024 g, 0.208 mmol).

Yield = 89 %

$[\alpha]_{\text{D}}^{27}$ - 70 (*c* 0.55, H_2O)

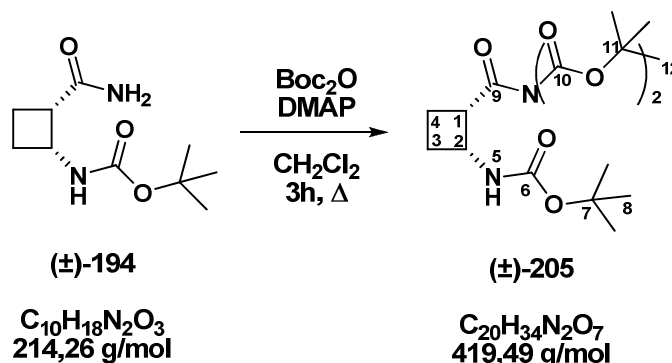
NMR ^1H (D_2O) δ (ppm) : 2.05 (m, 1H, H-4), 2.22 (m, 2H, H-3 and H-4), 2.35 (m, 1H, H-3), 3.22 (m, 1H, H-1), 3.92 (q, J = 7.2 Hz, 1H, H-2).

NMR ^{13}C (D_2O) δ (ppm) : 21.1 (CH_2 , C-3), 24.6 (CH_2 , C-4), 41.3 (CH, C-2), 45.4 (CH, C-1), 180.9 (C=O, C-6).

HPLC retention time: 10.9 min, ee > 97%.

Other data: as for **(±)-105**, page 185

**(±)-N-(11-*t*-butyloxycarbonyl)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxamide
(±)-205**



To a solution of **(±)-194** (0.025 g, 0.116 mmol) in dry CH_2Cl_2 (3 mL) was added successively DMAP (0.002 g, 0.016 Mmol) and di-*tert*-butyldicarbonate (0.066 g, 0.30 mmol) in dry CH_2Cl_2 (2 mL). The solution was stirred at reflux 3h. After return at room temperature, the solvent was evaporated and the crude was purified by flash chromatography using cyclohexane/EtOAc (90:10) as eluent to afforded compound **(±)-205** as white crystals (0.047 g, 0.112 mmol).

Yield = 97 %

TLC R_f = 0.70 (cyclohexane/EtOAc, 70:30)

MP = 87-89 °C

IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3401, 2966, 1647, 1546

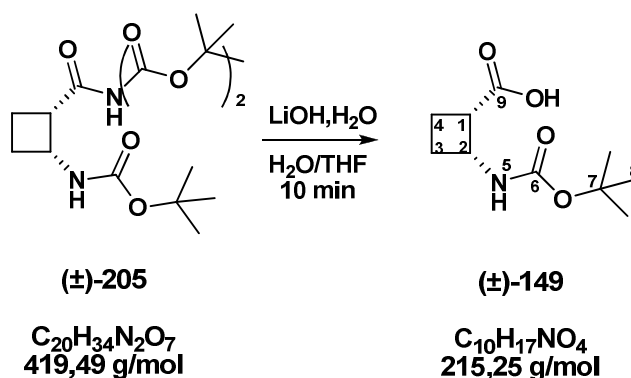
NMR ^1H (CDCl_3) δ (ppm) : 1.41 (s, 9H, H-8), 1.52 (s, 18H, H-12), 2.05-2.19 (m, 3H, H-4 and H-3), 2.32 (m, 1H, H-3), 4.17 (m, 1H, H-1), 4.56 (qu, J = 9.0 Hz, 1H, H-2), 5.56 (d, J = 9.0 Hz, 1H, H-5).

NMR ^{13}C (CDCl_3) δ (ppm) : 18.9 (C-4), 27.6 (6C-12), 28.4 (3C-8), 29.5 (C-3), 46.5 (C-1 and C-2), 79.2 and 84.8 (C-7 and C-11), 149.3 (2C-10), 154.8 (C-6), 175.1 (C-9).

HR-MS : m/z Calcd for $[\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7 + \text{Na}]^+$ 437.2264 ; Found 437.2250 (- 3.1 ppm)

Anal. : Calcd for $\text{C}_{20}\text{H}_{34}\text{N}_2\text{O}_7$: C, 57.9 ; H, 8.27 ; N, 6.76 ; Found C, 57.9 ; H, 8.28 ; N, 6.65

(±)-cis-2-[(*tert*-butyloxycarbonyl)amino]cyclobutanecarboxylic Acid (±)-149



At room temperature, LiOH, H₂O (0.010 g, 0.267 mmol) was added to a solution of **(±)-205** (0.028 g, 0.067 mmol) in THF/H₂O (1 mL, 1:1, v/v). The mixture was stirred 10 min and the THF was evaporated. The aqueous layer was washed with CH₂Cl₂ (2 x 3 mL). Successively, water (1 mL) and a solution of hydrochloric acid 1 M (0.25 mL) were added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 4 mL). The combined organic layers were dried on MgSO₄, filtrated and evaporated giving **(±)-149** a white powder (0.014 g, 0.065 mmol).

Yield = 97 %

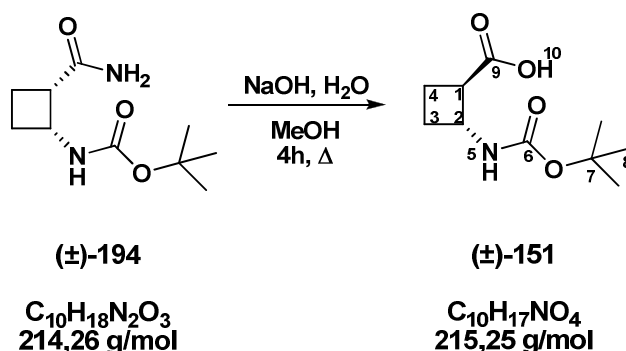
TLC R_f = 0.60 (EtOAc)

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9 H, H-8), 1.82 (m, 1H, H-4), 2.09 (m, 1H, H-4), 2.33 (m, 2H, H-3), 3.37 (m, 1H, H-1), 4.35 (qu, J = 8.6 Hz, 1H, H-2), 7.22 (bs, 1H, NH).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 16.7 (CH₂, C-4), 27.7 (3 CH₃, C-8), 28.1 (CH₂, C-3), 45.9 (CH, C-2), 47.3 (CH, C-1), 81.3 (C, C-7), 157.6 (C=O, C-6), 177.0 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-149**, page 200

(±)-*trans*-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxylic acid (±)-151



A solution of **(±)-194** (0.167 g, 0.78 mmol) in MeOH (35 mL) was treated with 6 M NaOH (11 mL) and the mixture was heated at reflux for 4 h. The methanol was then removed by careful evaporation under reduced pressure and the residual aqueous phase was washed with EtOAc (3 × 30 mL). The aqueous phase was then cooled at −5 °C, while concd HCl was added slowly until pH = 2. The aqueous phase was then extracted with EtOAc (3 × 60 mL) and the combined organic extracts were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. After flash chromatography (EtOAc/HOAc 99.7:0.3) the product **(±)-151** was obtained as a white powder (0.168 g, 0.78 mmol).

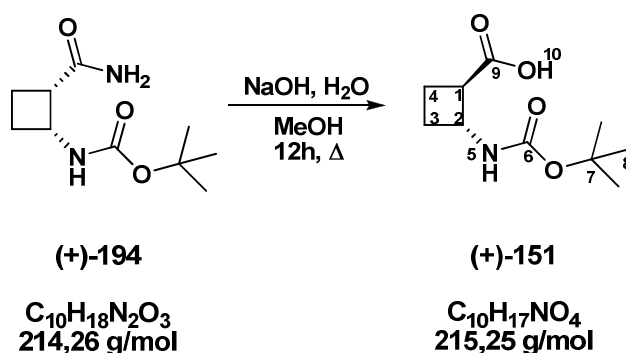
Yield = 100 %

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9H, H-8), 1.79 (qu, *J* = 10 Hz, 1H, H-4), 2.20 (m, 3H, H-4 et H-3), 3.13 (q, *J* = 8.0 Hz 1H, H-1), 4.10 (m, 1H, H-2), 5.05 (bs, 1H, H-5).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.6 (CH₂, C-3), 23.7 (CH₂, C-4), 28.2 (3 CH₃, C-8), 47.8 (CH, C-2), 48.7 (CH, C-1), 82.0 (C, C-7), 157.3 (C=O, C-6), 174.3 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-151**, page 209

(+)-(1*R*,2*R*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxylic acid (+)-(1*R*,2*R*)-151



A solution of **(+)-194** (0.460 g, 2.15 mmol) in MeOH (100 mL) was treated with 6 M NaOH (30.0 mL) and the mixture was heated at reflux for 12 h. The methanol was then removed by careful evaporation under reduced pressure and the residual aqueous phase was washed with EtOAc (3 × 40 mL). The aqueous phase was then cooled at −5 °C, while concd HCl was added slowly until pH = 2. The aqueous phase was then extracted with EtOAc (3 × 80 mL) and the combined organic extracts were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. Flash chromatography (EtOAc/HOAc 99.7:0.3) provided the title compound **(+)-151** as a white powder (0.462 g, 2.15 mmol).

Yield = 100 %

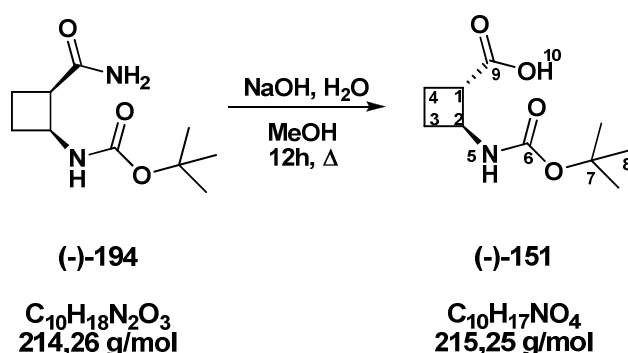
[α]_D²² + 44 (*c* 0.50, CHCl₃).

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9H, H-8), 1.79 (qu, *J* = 10 Hz, 1H, H-4), 2.20 (m, 3H, H-4 et H-3), 3.13 (q, *J* = 8.0 Hz 1H, H-1), 4.10 (m, 1H, H-2), 5.05 (bs, 1H, H-5).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.6 (CH₂, C-3), 23.7 (CH₂, C-4), 28.2 (3 CH₃, C-8), 47.8 (CH, C-2), 48.7 (CH, C-1), 82.0 (C, C-7), 157.3 (C=O, C-6), 174.3 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-151**, page 209

(–)-(1*S*,2*S*)-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxylic acid (–)-(1*S*,2*S*)-151



A solution of **(–)-194** (0.098 g, 0.46 mmol) in MeOH (20 mL) was treated with 6 M NaOH (7.0 mL) and the mixture was heated at reflux for 12 h. The methanol was then removed by careful evaporation under reduced pressure and the residual aqueous phase was washed with EtOAc (3 × 20 mL). The aqueous phase was then cooled at –5 °C, while concd HCl was added slowly until pH = 2. The aqueous phase was then extracted with EtOAc (3 × 40 mL) and the combined organic extracts were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. Flash chromatography (EtOAc/HOAc 99.7:0.3) provided the title compound **(–)-151** as a white powder (0.099 g, 0.46 mmol).

Yield = 100 %

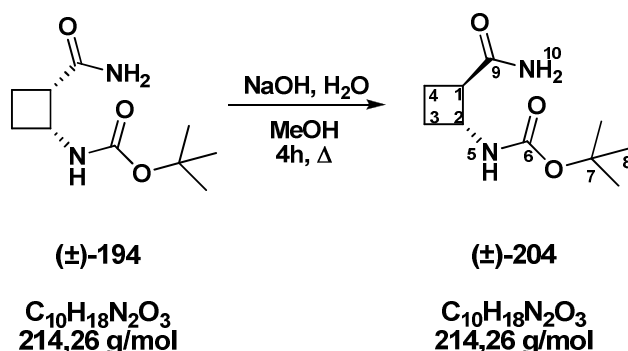
[α]_D²² – 44 (*c* 0.5, CHCl₃).

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9H, H-8), 1.79 (qu, *J* = 10 Hz, 1H, H-4), 2.20 (m, 3H, H-4 et H-3), 3.13 (q, *J* = 8.0 Hz 1H, H-1), 4.10 (m, 1H, H-2), 5.05 (bs, 1H, H-5).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.6 (CH₂, C-3), 23.7 (CH₂, C-4), 28.2 (3 CH₃, C-8), 47.8 (CH, C-2), 48.7 (CH, C-1), 82.0 (C, C-7), 157.3 (C=O, C-6), 174.3 (C=O, C-9).

Other data: as for **(±)-151**, page 209

(±)-trans-2-(*t*-butyloxycarbonylamino)cyclobutanecarboxylic acid (±)-204



A solution of **(±)-194** (0.100 g, 0.46 mmol) in MeOH (20 mL) was treated with 0.04 M NaOH solution (0.74 mL) and the mixture was heated at reflux for 4 h. The solution was cooled at 0 °C and concentrated HCl was added slowly until pH = 3. The methanol was then evaporated by careful evaporation under reduced pressure and the residual aqueous phase was extracted with EtOAc (3 × 20 mL). Combined organic extracts were dried with MgSO₄ and concentrated under vacuum. The solid residue was purified by flash chromatography using EtOAc/cyclohexane 80:20 to afford the product **(±)-204** as a white powder (0.069 g, 0.32 mmol).

Yield = 70 %

TLC *R_f* = 0.26 (EtOAc)

MP = 208–210 °C

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3370, 1686, 1636, 1541

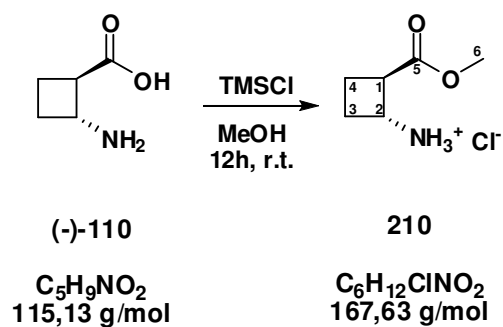
NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.44 (s, 9H, H-8), 1.74 (m, 1H, H-4), 1.97 (m, 1H, H-4), 2.13 (m, 1H, H-3), 2.21 (m, 1H, H-3), 2.94 (dt, *J* = 8.7 and 9.4 Hz, 1H, H-1), 4.15 (m, 1H, H-2), 4.90 (br s, 1H, H-5), 5.32 (br s, 1H, H-10), 8.00 (br s, 1H, H-10).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.4 (CH₂, C-3), , 24.6 (CH₂, C-4), 28.3 (3CH₃, C-8), 49.0 (CH, C-2), 49.5 (CH, C-1), 80.5 (C, C-7), 155.0 (C=O, C-6), 170.3 (C=O, C-9).

HR-MS : *m/z* Calcd for [C₁₀H₁₈N₂O₃+Na]⁺ 237.1215 ; Found 237.1224 (+ 0.2 ppm)

Anal. : calcd for C₁₀H₁₈N₂O₃: C, 56.06; H, 8.47; N, 13.07; Found C, 56.13; H, 8.41; N, 12.97.

(1*R*,2*R*)-1-(methoxycarbonyl)cyclobutane-2-ammonium chloride **210**



To a solution of **(-)-110** (0.058 g, 0.503 mmol) in dry methanol (2.5 mL) was added at room temperature trimethylsilylchloride (0.158 g, 0.190 mL) and the solution was stirred overnight. The methanol was then evaporated and the aminoester hydrochloride **210** was directly engaged in the next reaction.

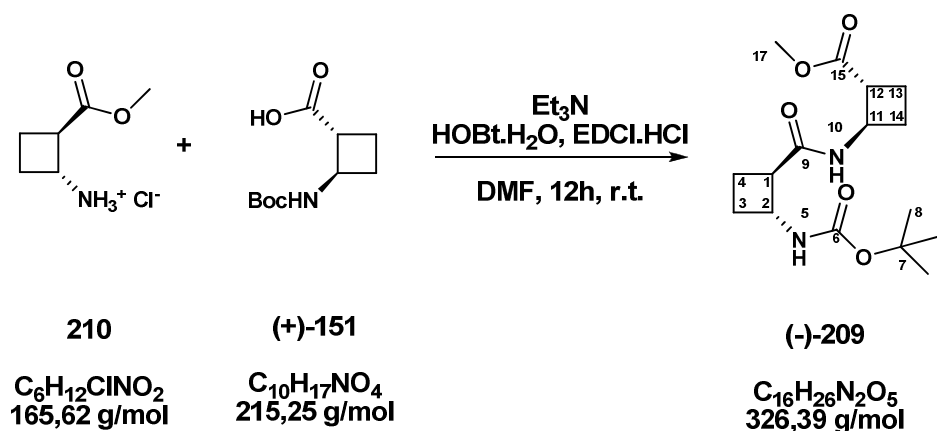
(0.084 g, 0.503 mmol).

Yield = 100 %

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.98-2.14 (m, 2H, H-3 and H-4), 2.25 (m, 2H, H-3 and H-4), 3.40 (q, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-1), 3.72 (s, 3H, H-6), 4.02 (q, *J* = 7.9 Hz, 1H, H-2).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.8 (CH₂, C-3), 23.1 (CH₂, C-4), 42.6 (CH, C-2), 46.5 (CH, C-1), 52.5 (CH₃, C-6), 173.1 (C=O, C-5).

Boc-[*trans*-(1*R*,2*R*)-ACBC]₂-OMe (-)-209



Aminoester hydrochloride salt **210** (0.144 g, 0.869 mmol) was added to a solution of **(+)-151** (0.188 g, 0.872 mmol) in DMF (11 mL). HOBT (0.157 g, 1.030 mmol) and triethylamine (0.104 g, 0.143 mL, 0.872 mmol) were added and the mixture was stirred until all reagents were dissolved. Then EDCI.HCl (0.250 g, 1.31 mmol) was added and the resulting solution was protected from light and was stirred at room temperature overnight. EtOAc (20 mL) was added and then the solution was washed successively with solution of citric acid 5 % (10 mL), saturated aqueous NaHCO₃ (10 mL). The organic layer was dried with MgSO₄, filtrated and evaporated. The crude was purified by flash chromatography, with EtOAc/MeOH (95:5) to afford **(-)-209** as a white powder (0.242 g, 0.741 mmol).

Yield = 85 %

TLC *R_f* = 0.50 (EtOAc/cyclohexane, 1:1)

[α]_D²⁰ – 51 (c 0.55, CHCl₃)

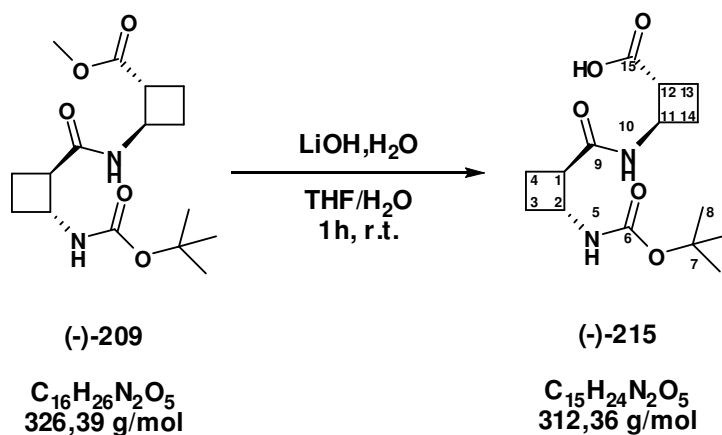
MP = 148-151 °C

IR (KBr) *ν* (cm⁻¹) = 3387, 3298, 1651, 1612, 1523

NMR ¹H (CDCl₃) **δ** (ppm) : 1.45 (s, 9H, H-8), 1.71-2.23 (m, 8H, H-3, H-4, H-13 and H-14), 2.84 (q, *J* = 8.9 Hz, 1H, H-1), 3.10 (q, *J* = 8.8 Hz, 1H, H-12), 3.68 (s, 3H, H-16), 4.10 (m, 1H, H-2), 4.51 (m, 1H, H-11), 4.97 (bs, 1H, H-5), 8.45 (bs, 1H, H-10).

NMR ¹³C (CDCl₃) **δ** (ppm) : 18.8 (CH₂), 19.0 (CH₂), 24.9 (CH₂), 27.2 (CH₂), 28.6 (3CH₃, C-8), 46.9 (CH, C-12), 47.5 (CH, C-11), 48.9 (CH, C-2), 50.5 (CH, C-1), 52.1 (CH₃, C-16), 80.8 (C, C-7), 156.7 (C=O, C-6), 172.5 (C=O, C-9), 173.9 (C=O, C-15).

HR-MS : *m/z* Calcd for [C₁₆H₂₆N₂O₅+Na]⁺ 349.1739 ; Found 349.1725 (+ 1.4 ppm)

Boc-[*trans*-(1*R*,2*R*)-ACBC]₂-OH (–)-215

At room temperature, LiOH.H₂O (0.012 g, 0.260 mmol) was added to a solution of (–)-**209** (0.085 g, 0.260 mmol) in THF/H₂O (3 mL, 1:1, v/v). The mixture was stirred 1h and the solvent was evaporated. Successively, water (1 mL) and a hydrochloric acid solution 1 M (2 mL) were added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 3 mL). The combined organics layers were dried on MgSO₄, filtrated and evaporated giving (–)-**215** as a white powder (0.081 g, 0.259 mmol).

Yield = 99 %

TLC *R_f* = 0.50 (EtOAc)

[α]_D²⁰ – 31 (*c* 0.78, CHCl₃)

MP = 181-184 °C

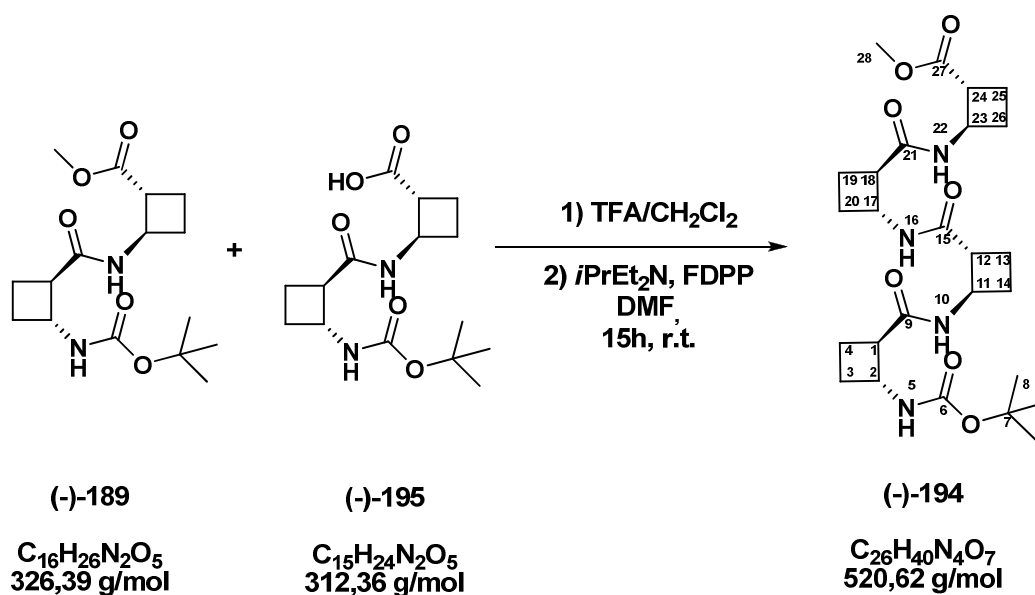
IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3375, 3254, 1691, 1667, 1623, 1509

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.44 (s, 9H, H-8), 1.79-2.20 (m, 8H, H-3, H-4, H-13 and H-14), 2.95 (q, *J* = 8.7 Hz, 1H, H-1), 3.16 (q, *J* = 7.8 Hz, 1H, H-12), 4.14 (m, 2H, H-2 and H-11), 5.02 (bs, 1H, H-5), 9.32 (bs, 1H, H-10).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.5 (CH₂), 19.3 (CH₂), 22.4 (CH₂), 24.7 (CH₂), 28.6 (3CH₃, C-8), 48.5 (CH, C-12), 48.9 (CH, C-11), 49.2 (CH, C-2), 49.8 (CH, C-1), 81.4 (C, C-7), 157.1 (C=O, C-6), 175.0 (C=O, C-9), 176.1 (C=O, C-15).

HR-MS : *m/z* Calcd for [C₁₅H₂₄N₂O₅+Na]⁺ 335.1583 ; Found 335.1590 (+ 0.7 ppm)

Boc-[*trans*-(1*R*,2*R*)-ACBC]₄-OMe (–)-214



To a solution of (–)-**209** (0.085 g, 0.260 mmol) in CH_2Cl_2 (3 mL) cooled at 0 °C, TFA (1.5 mL) was added and the solution was stirred until completion of the reaction within 30 min. The excess of TFA was then evaporated and the resultant TFA salt was directly introduced in a solution of (–)-**215** (0.081 g, 0.259 mmol) in DMF (3.0 mL). $iPrEt_2N$ (0.101 g, 129 μ L, 0.781 mmol) and FDPP (0.120 g, 0.312 mmol) were added at 0 °C successively to the solution and the stirring was maintained 15 h at room temperature. DMF was evaporated and the crude was purified by chromatography using EtOAc/MeOH (9:1) as eluent to furnish (–)-**214** as a white sticky solid (0.126 g, 0.242 mmol).

Yield = 93 %

TLC R_f = 0.61 (EtOAc/MeOH, 95:5)

$[\alpha]_D^{22}$ – 90 (c 0.58, $CHCl_3$)

MP = 215-218 °C

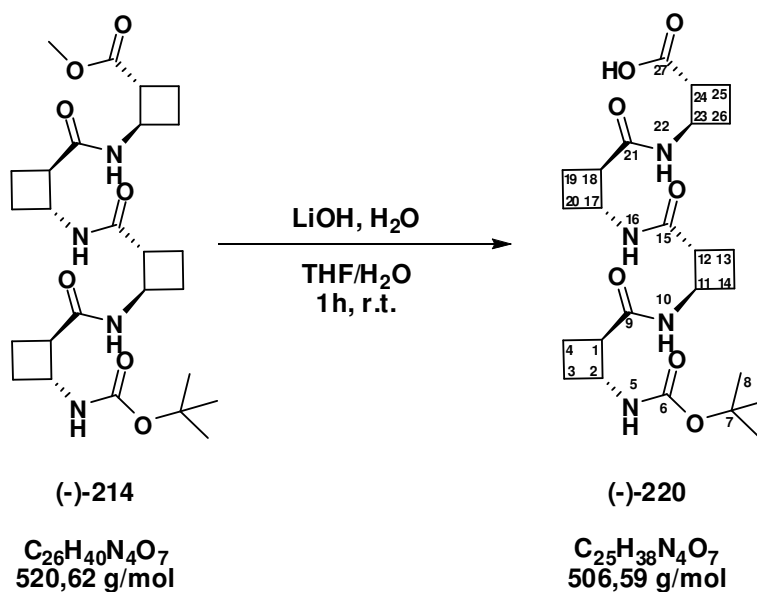
IR (KBr) ν (cm^{-1}) = 3312, 1687, 1648, 1617, 1555

NMR 1H (pyridine- d_5) δ (ppm) : 1.46 (s, 9H, H-8), 1.75-1.86 (m, 3H, CH_2 , H-4, H-13, H-19), 1.94-2.16 (m, 8H, CH_2 , H-3, H-14, H-20, H-25), 2.21-2.42 (m, 5H, CH_2 , H-4, H-13, H-19, H-26), 3.02 (q, J = 8.1 Hz, 1H, H-12), 3.09 (q, J = 8.6 Hz, 1H, H-1), 3.35 (q, J = 8.8 Hz, 1H, H-18), 3.66 (s, 3H, H-28), 3.67 (m, 1H, H-24), 4.47 (qu, J = 8.3 Hz, 1H, H-2), 4.79 (qu, J = 8.4 Hz, 1H, H-11), 4.86 (qu, J = 8.4 Hz, 1H, H-17), 5.01 (m, 1H, H-23), 8.44 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-16), 8.64 (d, J = 7.1 Hz, 1H, H-5), 9.01 (d, J = 7.4 Hz, 1H, H-22), 9.38 (d, J = 8.0 Hz, 1H, H-10).

NMR ^{13}C (pyridine- d_5) δ (ppm) : 17.1 (CH_2 , C-13), 17.4 (CH_2 , C-19), 18.0 (CH_2 , C-4), 19.7 (CH_2 , C-25), 25.4 (CH_2 , C-14), 25.8 (CH_2 , C-3), 26.2 (CH_2 , C-20), 27.7 (CH_2 , C-26), 28.9 (3CH_3 , C-8), 47.2 (CH_α , C-24), 48.6 (CH_β , C-23), 49.2 (CH_β , C-17), 49.5 (CH_β , C-11), 50.4 (CH_α , C-18), 50.8 (CH_β , C-2), 51.3 (2CH_α , C-1 and C-12), 51.9 (CH_3 , C-28), 79.6 (CH , C-7), 157.0 ($\text{C}=\text{O}$, C-6), 172.7 ($\text{C}=\text{O}$, C-21), 172.8 ($\text{C}=\text{O}$, C-15), 173.8 ($\text{C}=\text{O}$, C-9), 174.6 ($\text{C}=\text{O}$, C-27).

HR-MS : m/z Calcd for $[\text{C}_{26}\text{H}_{40}\text{N}_4\text{O}_7+\text{H}]^+$ 521.2975 ; Found 521.2981 (+ 0.6 ppm)

Boc-[*trans*-(1*R*,2*R*)-ACBC]₄-OH (–)-220



At room temperature, LiOH, H₂O 0.075 M in THF/H₂O (0.049 mmol, 0.62 mL, 1:1, v/v) was added to a solution of (–)-214 (0.025 g, 0.0486 mmol) in THF (1.5 mL). The mixture was stirred 1h. and the solvent was evaporated. Successively, water (1.5 mL) and a hydrochloric acid solution 1 M (0.75 mL) was added and the aqueous layer was extracted with EtOAc (3 x 3 mL). The combined organics layers were dried on MgSO₄, filtrated and evaporated giving (–)-220 a white powder (0.024 g, 0.0480 mmol).

Yield = 99 %

TLC R_f = 0.37 (EtOAc/MeOH, 95:5)

$[\alpha]_D^{22}$ – 111 (*c* 0.35, CHCl₃)

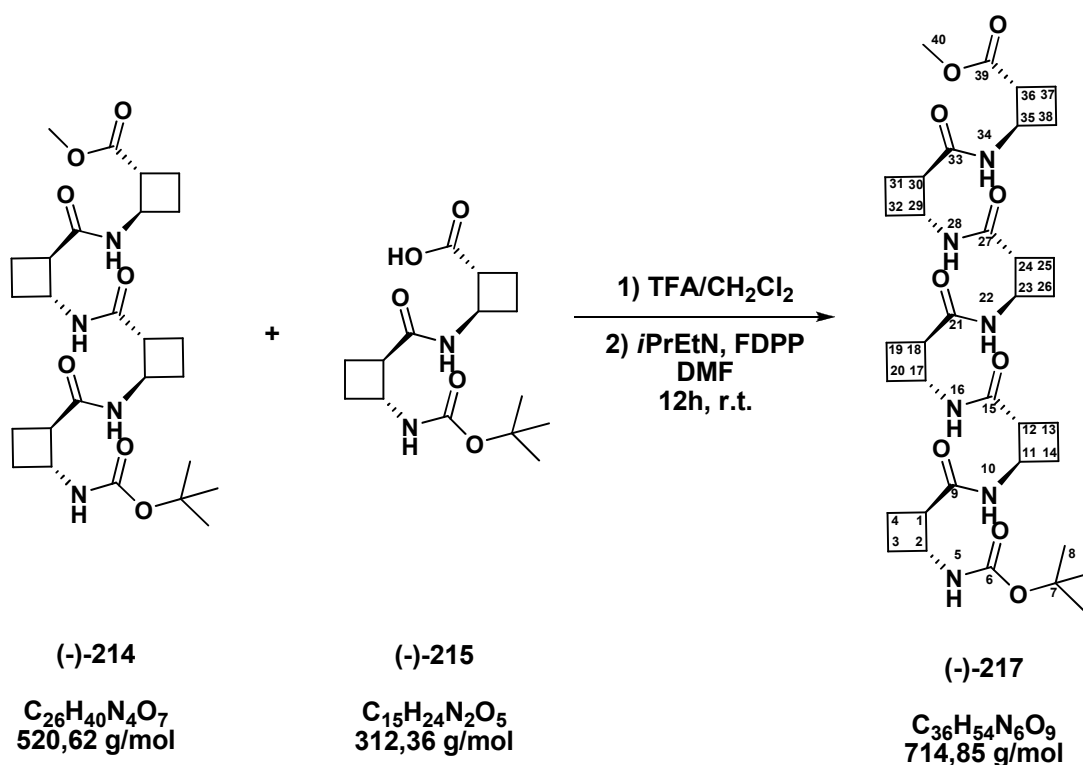
MP = 230-233 °C

IR (KBr) ν (cm⁻¹) = 3389, 3302, 1680, 1645, 1634, 1521

NMR ¹H (CDCl₃) δ (ppm) : 1.45 (s, 9H, H-8), 1.79-2.23 (m, 16H, CH₂), 2.91-3.00 (m, 3H, CH_a), 3.20 (m, 1H, CH_a), 4.14 (m, 2H, CH_β), 4.28 (m, 2H, CH_β), 5.07 (bs, 1H, H-5), 8.45 (bs, 1H, NH), 9.13 (bs, 1H, NH), 9.67 (m, 1H, NH).

NMR ¹³C (CDCl₃) δ (ppm) : 18.0 (2CH₂), 18.9 (CH₂), 22.5 (CH₂), 23.6 (2CH₂), 24.7 (CH₂), 28.3 (3CH₃, C-8), 29.7 (CH₂), 48.0 (CH), 48.3 (CH), 48.4 (CH), 48.8 (CH), 49.0 (2CH), 49.7 (CH), 50.1 (CH), 80.9 (C, C-7), 156.4 (C=O, C-6), 174.3 (C=O), 174.7 (C=O), 175.0 (C=O), 176.0 (C=O).

Boc-[*trans*-(1*R*,2*R*)-ACBC]₆-OMe (–)-217



After cooling the solution at 0 °C, TFA (0.75 mL) was added to a solution of (–)-**214** (0.031 g, 0.059 mmol) in CH₂Cl₂ (3 mL) and the solution was stirred until completion of the deprotection within 30 min. The excess of TFA was then evaporated and the resultant TFA salt was directly introduced in a solution of (–)-**215** (0.019 g, 0.059 mmol) in DMF (2.0 mL). *i*PrEt₂N (0.023 g, 31 μL, 0.18 mmol) and FDPP (0.027 g, 0.070 mmol) were added at 0 °C successively to the solution and the stirring was maintained 12h at room temperature. DMF was evaporated and the crude was purified by chromatography using EtOAc/MeOH (9:1) as eluent to furnish (–)-**217** as a white sticky solid (0.031 g, 0.044 mmol).

Yield = 75 %

TLC *R_f* = 0.25 (EtOAc/MeOH, 9:1)

[α]_D²² – 55 (*c* 0.071, CHCl₃)

MP = 132-135 °C

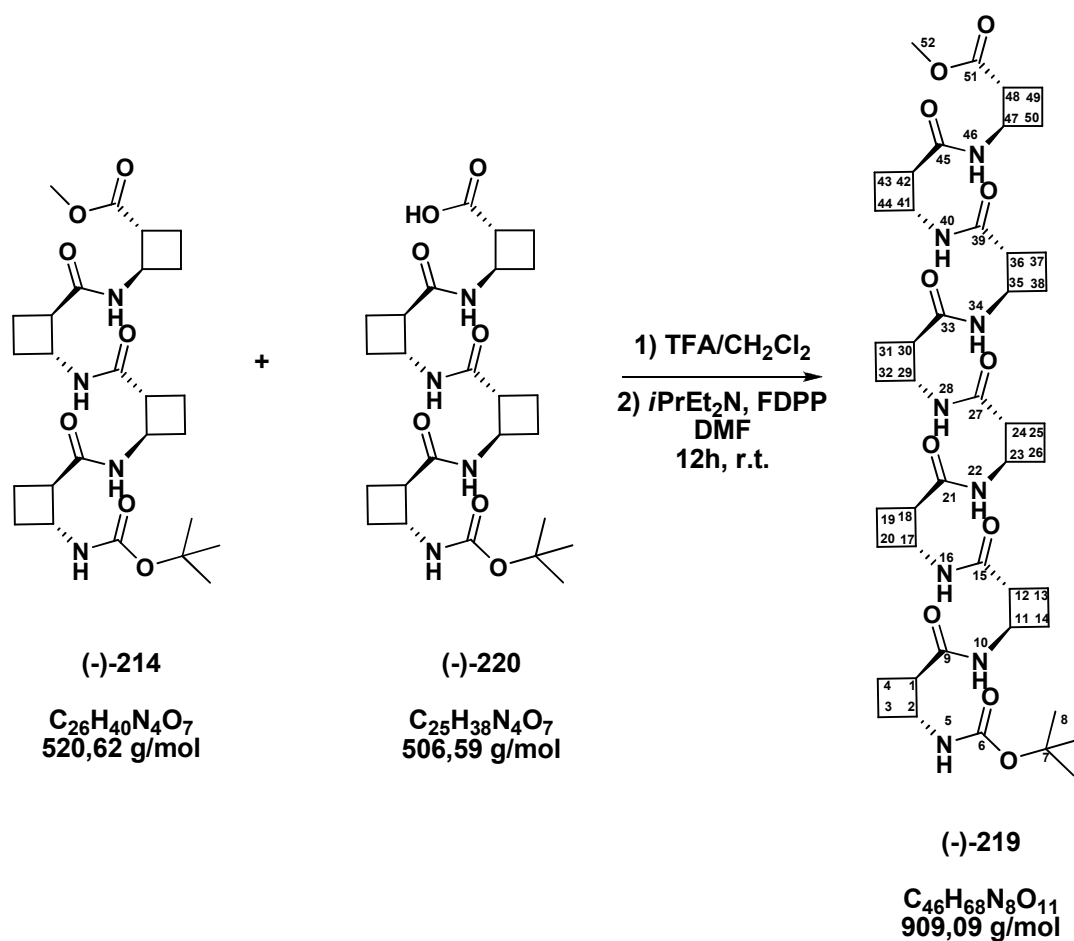
IR (KBr) ν (cm^{–1}) = 3298, 1653, 1623, 1512

NMR ¹H (pyridine-*d*₅) δ (ppm) : 1.51 (s, 9H, H-8), 1.70-1.81 (m, 5H, CH₂), 1.90-2.55 (m, 19H, CH₂), 2.94 (q, *J* = 9.3 Hz, 1H, CH_α, H-12), 3.11 (q, *J* = 8.7 Hz, 1H, CH_α, H-1), 3.27 (q, *J* = 9.2 Hz, 1H, CH_α, H-18), 3.35 (q, *J* = 9.2 Hz, 1H, CH_α, H-24), 3.48 (q, *J* = 9.0 Hz, 1H, CH_α,

H-30), 3.72 (s, 3H, H-40), 3.81 (q, $J = 8.8$ Hz, 1H, CH_α, H-36), 4.51 (qu, $J = 8.0$ Hz, 1H, CH_β, H-2), 4.72 (qu, $J = 7.6$ Hz, 1H, CH_β, H-11), 4.80 (qu, $J = 8.7$ Hz, 1H, CH_β, H-17), 4.96 (qu, $J = 8.3$ Hz, 1H, CH_β, H-23), 5.02 (qu, $J = 8.5$ Hz, 1H, CH_β, H-29), 5.12 (qu, $J = 8.3$ Hz, 1H, CH_β, H-35), 8.54 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH, H-16), 8.69 (d, $J = 9.5$ Hz, 1H, NH, H-28), 8.80 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH, H-5), 8.90 (d, $J = 7.4$ Hz, 1H, NH, H-34), 8.98 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, NH, H-22), 9.62 (d, $J = 8.0$ Hz, 1H, NH, H-10).

NMR ¹³C (pyridine-d₅) δ (ppm) : 16.4 (CH_{2δ}, C-25), 16.6 (CH_{2δ}, C-19), 16.9 (CH_{2δ}, C-13), 17.1 (CH_{2δ}, C-31), 17.7 (CH_{2δ}, C-4), 19.7 (CH_{2δ}, C-37), 25.5 (CH_{2γ}, C-14), 26.0 (2CH_{2γ}, C-3 and C-20), 26.3 (2CH_{2γ}, C-26 and C-32), 27.7 (CH_{2γ}, C-38), 28.9 (3CH₃, C-8), 47.1 (CH, C-36), 48.7 (CH, C-35), 49.3 (CH, C-29), 49.8 (CH, C-23), 49.9 (2CH, C-11 and C-17), 50.8 (CH, C-30), 51.0 (CH, C-2), 51.1 (CH, C-18), 51.2 (CH, C-24), 51.4 (CH, C-1), 51.7 (CH, C-12), 51.9 (CH, C-40), 79.8 (C, C-7), 157.0 (C=O, C-6), 172.5 (C=O, C-27), 172.8 (C=O, C-33), 173.1 (C=O, C-21), 173.3 (C=O, C-15), 173.8 (C=O, C-9), 174.8 (C=O, C-39).

Boc-[*trans*-(1*R*,2*R*)-ACBC]₈-OMe (–)-219



Protected tetrapeptide **(–)-214** (0.025 g, 0.048 mmol) was dissolved in dry CH₂Cl₂ (3 mL). After cooling the solution at 0 °C, TFA (0.75 mL) was added dropwise and the mixture was stirred until completion of the deprotection within 30 min. The solvent was then evaporated and the resultant salt was dissolved in DMF (3.0 mL). **(–)-220** (0.025 g, 0.049 mmol) and *i*PrEt₂N (0.019 g, 25.0 μL, 0.140 mmol) were added at 0 °C, followed by FDPP (0.022 g, 0.018 mmol) and the mixture was stirred 12h at room temperature. The crude mixture was purified by flash chromatography using EtOAc/Methanol (95:5) to afford **(–)-200** as a white sticky powder (0.025 g, 0.27 mmol).

Yield = 56 %

TLC *R_f* = 0.55 (EtOAc/Methanol, 9:1)

[α]_D – 64 (*c* 0.087, CHCl₃)

MP = 207-210 °C

IR (KBr) *ν* (cm^{–1}) = 3305, 1649, 1612, 1516

NMR ^1H (pyridine- d_5) δ (ppm) : 1.52 (s, 9H, H-8), 1.71-2.55 (m, 32H, CH_2), 2.97 (q, $J = 9.0$ Hz, 1H, H_α , H-12), 3.14 (q, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_α , H-1), 3.27 (q, $J = 9.0$ Hz, 1H, H_α , H-18), 3.34-3.36 (m, 2H, H-24 and H-30), 3.41 (q, $J = 8.9$ Hz, 1H, H_α , H-36), 3.53 (q, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_α , H-42), 3.73 (s, 3H, H-52), 3.83 (q, $J = 8.7$ Hz, 1H, H_α , H-48), 4.54 (qu, $J = 8.4$ Hz, 1H, H_β , H-2), 4.74 (qu, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_β , H-11), 4.81 (qu, $J = 8.6$ Hz, 1H, H_β , H-17), 4.85-4.89 (m, 2H, H_β , H-23 and H-29), 4.98 (m, 1H, H_β , H-35), 5.03 (m, 1H, H_β , H-41), 5.13 (qu, $J = 8.3$ Hz, 1H, H_β , H-47), 8.65 (d, $J = 9.3$ Hz, 1H, NH, H-16), 8.73 (m, 1H, NH, H-40), 8.82 (d, $J = 7.6$ Hz, 1H, NH, H-5), 8.91 (d, $J = 7.5$ Hz, 1H, NH, H-46), 8.95-8.97 (m, 2H, NH, H-28 and H-34), 9.05 (d, $J = 9.2$ Hz, 1H, NH, H-22), 9.66 (d, $J = 8.1$ Hz, 1H, H_β , H-10).

NMR ^{13}C (pyridine- d_5) δ (ppm) : 16.3 (CH_2), 16.0 (3CH_2), 16.9 (CH_2), 17.0 (CH_2), 17.8 (CH_2), 19.8 (CH_2), 26.0 (CH_2), 26.1 (3CH), 26.2 (CH_2), 26.3 (CH_2), 26.4 (CH_2), 27.7 (2CH_2), 28.9 (3CH_3 , C-8), 47.0 (CH), 48.8 (CH), 49.4 (CH), 49.9 (4CH), 50.0 (CH), 50.1 (CH), 50.7 (CH), 50.9 (CH), 51.0 (CH), 51.2 (CH), 51.4 (2CH), 51.7 (CH), 51.9 (CH), 79.8 (C, C-7), 157.0 (C=O), 172.6 (C=O), 172.8 (C=O), 173.1 (C=O), 173.3 (C=O), 173.40 (C=O), 174.42 (C=O), 173.8 (C=O, C-51).

Conditions for enantiomeric excess analysis of *cis*- and *trans*-ACBC :

Instrument: DIONEX (P680 pump, ASI-100 autosampler, TCC-100 column compartment, UVD 340 U detector)

Chiral column: (CROWNPAK-CR+) for amino acids

Temperature: 5 °C

Flow (mL/min): 0.3

Eluant: perchloric acid (16.7 g per Litre of distilled water; pH = 1)

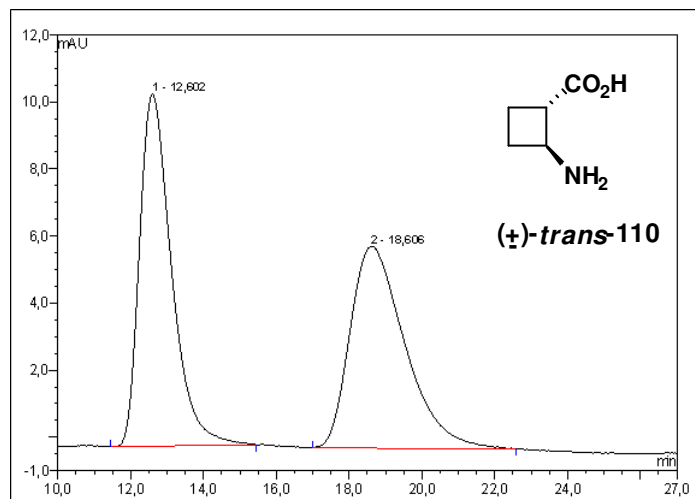
Sample: 5 to 9 mg of analysis product in 1 mL

Injected volume: 5 µL

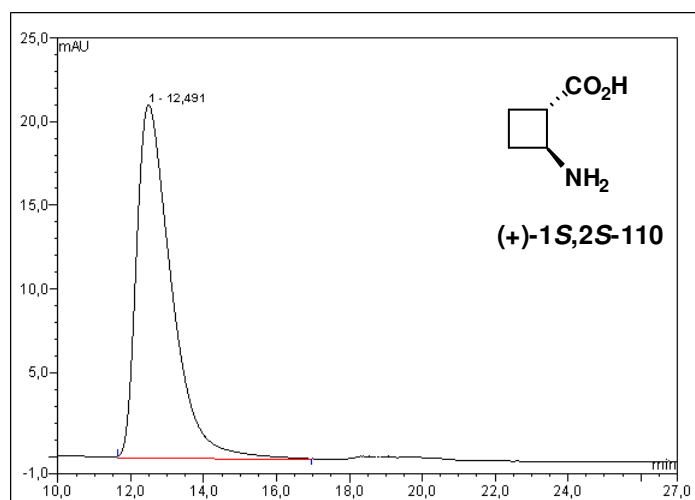
Maximum absorption wavelenght (λ = nm): 220

Chiral hplc chromatogrammes of *trans*-amino acids

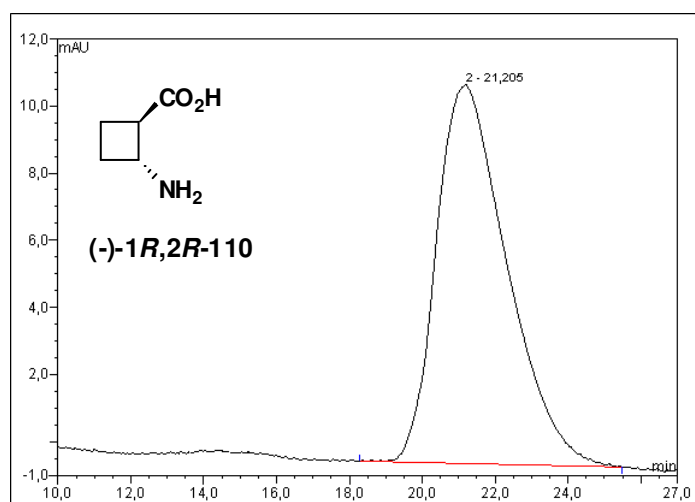
(±)-*trans*-110



(+)-(1*S*,2*S*)-110

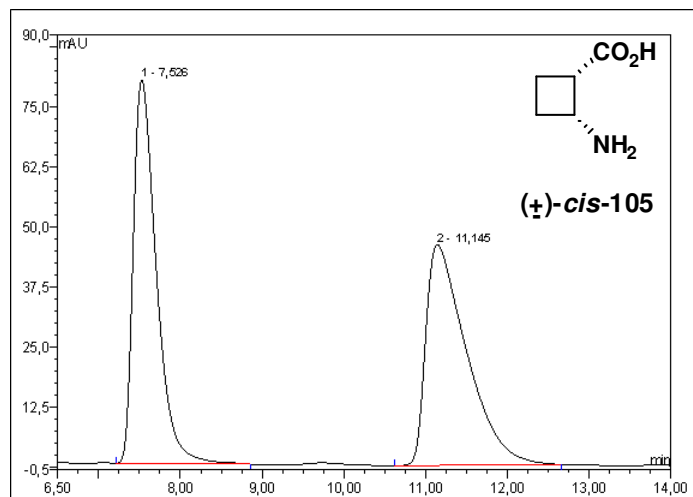


(-)-(1*R*,2*R*)-110

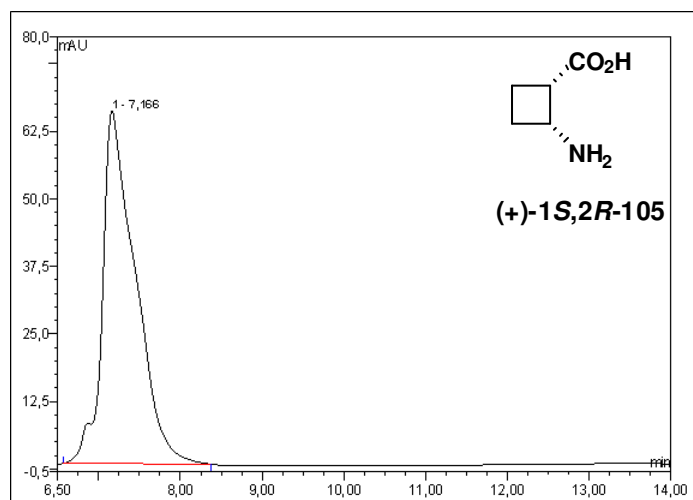


Chiral hplc chromatogrammes of *cis*-amino acids

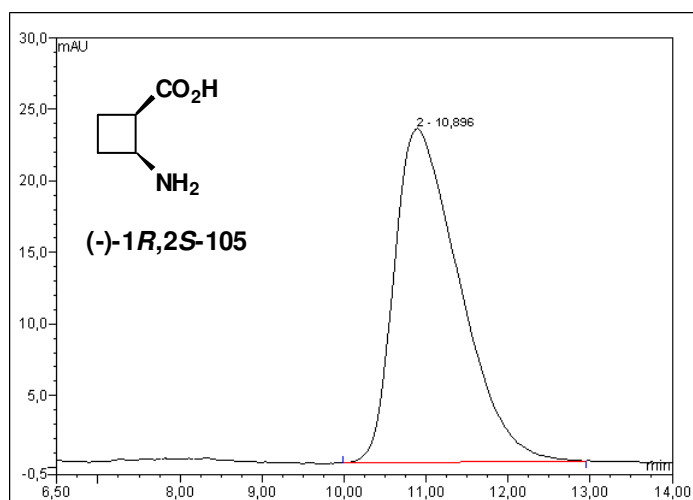
(±)-*cis*-105



(+)-(1*S*,2*R*)-105



(-)-(1*R*,2*S*)-105



RESUME

La synthèse de β -aminoacides, analogues structuraux des α -aminoacides, constitue un enjeu essentiel dans le développement d'oligopeptides. Un long travail a été mené sur le comportement des β -peptides (enchaînement de β -aminoacides) ainsi que les peptides mixtes (mélange d' α - et β -aminoacides). Il en résulte que la préférence conformationnelle des β -aminoacides va induire l'apparition d'une structure tridimensionnelle ordonnée de l'oligopeptide. Ainsi, plusieurs types d'hélices, des feuillets et des coudes ont été observés sur des β -oligopeptides. En plus de cette fascinante particularité, les β -peptides et les peptides mixtes ont montré une grande stabilité vis-à-vis des enzymes digestives. Ces caractéristiques sont importantes dans le développement de nouveaux médicaments, mimes de structures protéiques. Au laboratoire, nous travaillons sur le β -aminoacide cyclobutanique comme bloc de construction de structures moléculaires élaborées dont les β -peptides.

La partie bibliographique, scindée en deux parties, décrit la synthèse de β -aminoacides carbocycliques puis les différents types de structures secondaires obtenus à partir de peptides composés de β -aminoacides.

Des travaux ont été menés sur les β -aminoacides cycliques à 6, 5 et à 4 chaînons. Cependant, aucuns travaux n'ont été décrits sur le *trans*- β -aminoacide cyclobutanique « *trans*-ACBC ».

Nous avons entrepris d'accéder au *cis*- et *trans*-ACBC optiquement enrichis et nous avons mis au point deux voies de synthèse à l'échelle multigramme. L'étape clé, commune aux deux synthèses et la photocycloaddition [2+2] entre l'éthylène et un partenaire α -cétone pour créer le cyclobutane. A l'aide de méthodes de couplages peptidiques, nous avons préparé le dimère, le tétramère, l'hexamère et l'octamère du 1*R*,2*R*- *trans*-ACBC.

Grâce à plusieurs techniques de caractérisation couramment utilisées dans l'étude conformationnelle de polypeptides, nous avons pu déterminer avec certitude l'existence d'une hélice-12 dès l'hexamère. En parallèle, nous avons mené une étude complète de modélisation moléculaire qui nous a conduits à un résultat identique.

Ce travail sur la synthèse des ACBC optiquement purs et sur le comportement des β -peptides cyclobutaniques complète le tableau des β -peptides carbocycliques. Nous envisageons de préparer des β -aminoacides cyclobutaniques fonctionnalisés, afin de construire des β -peptides structurés, destinés à une application en chimie médicinale.

Mots-clés : β -aminoacides, β -peptides, cyclobutane, photocycloaddition [2+2], foldamères, synthèse diastéréosélective, dédoublement racémique.